

**Mitochondriale Transportproteine  
in *Saccharomyces cerevisiae***

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Matthias Schauen**

aus Oberhausen

Köln, 2002

Berichterstatter:

Professor Dr. Reinhard Krämer  
Privatdozentin Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der Disputation: 9. Juli 2002

"Hey, this bug makes wine, beer and bread! Why work with anything else?"

The Gietz Lab Yeast Transformation Home Page

(<http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietz/Trafo.html>)



## Mitochondrial Transport Proteins In *Saccharomyces cerevisiae*

The members of the Mch protein family of *Saccharomyces cerevisiae* are homologs of the MCT protein family of mammals (monocarboxylate transporters). An Mch3p-HA fusion protein was localized in the mitochondria of yeast. Pyruvate uptake of isolated mitochondria from WT- and *mch1-5*-cells was not different. There was no difference between WT und *mch1-5*-cells in growth behaviour with different carbon sources, in lactic acid content and in ethanol production. The phenotype of *mch3-* and *mch1-5*-cells in aerobic glucose limited slow growing continuous culture was similar to the phenotype of pyruvate dehydrogenase negative *pda1*-cells. Mch3p und Mch4p are induced by aromatic amino acids, but tryptophan uptake activity in isolated mitochondria was not induced by aromatic amino acids. WT, *mch3-* and *mch1-5*-cells had the same growth behaviour with tryptophan as sole N-source.

A *YHM1* deletion mutant was arginine-bradytrophic in medium with glucose as carbon source and ammonium as nitrogen source, in media with nonfermentable carbon sources or other nitrogen sources arginine supplementation was not sufficient to compensate for the deletion of *YHM1*. Deletion of *YHM1* led to changes in the intracellular amino acid pools that can be explained by a disturbed arginine biosynthesis. Arginine-bradytrophism and changed amino acid pool occurred also in *ort1* mutants, the effects of both deletions on the growth of yeast cells added up in *yhm1/ort1* mutants. Isolated mitochondria from *yhm1/ort1*-cells showed scarcely changed uptake of arginine and ornithine compared to WT.

## Mitochondriale Transportproteine in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Mch-Proteinfamilie (*monocarboxylate permease homologs*) in *Saccharomyces cerevisiae* wurde aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Mitglieder zu den MCT-Proteinen (*monocarboxylate transport proteins*) in Säugern identifiziert, die Monocarboxylate über die Plasmamembran transportieren.

Ein Mch3p-HA-Fusionsprotein wurde in isolierten Mitochondrien aus *S. cerevisiae* nachgewiesen. Die pyruvatabhängige Atmungsaktivität isolierter intakter Mitochondrien aus Zellen, bei denen *MCH3* oder alle 5 *MCH*-Mitglieder deletiert waren, war von der von Mitochondrien aus WT-Zellen nicht zu unterscheiden. In aerober glucoselimitierter langsam wachsender kontinuierlicher Kultur hatten *mch3*- und *mch1-5*-Zellen eine niedrigere Trockenmasseausbeute als WT-Zellen, ähnlich wie Pyruvatdehydrogenase-negative *pda1*-Zellen. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Pyruvataufnahmeaktivität isolierter Mitochondrien aus WT- und *mch1-5*-Zellen gezeigt werden. Die Expression von *MCH3* wird von aromatischen Aminosäuren induziert, isolierte Mitochondrien aus *mch1-5*-Zellen zeigten aber keine verringerte Tryptophanaufnahme.

Zellen, denen *YHM1*, ein Mitglied der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF), fehlt, zeigten eine Arginin-Bradytrophie: ohne Arginin im Medium konnten die Zellen nur langsam wachsen. Die Deletion von *YHM1* führte zu Veränderungen der intrazellulären Aminosäurepools, die durch eine gestörte Arginin-Synthese erklärt werden können. Arginin-Bradytrophie und veränderter Aminosäurepool traten auch bei *ort1*-Mutanten auf, die Effekte der beiden Deletionen auf das Wachstum von Hefezellen addierten sich in *yhm1/ort1*-Zellen. Die *yhm1/ort1*-Zellen konnten jedoch noch langsam ohne Arginin wachsen. Isolierte Mitochondrien aus *yhm1/ort1*-Zellen zeigten eine kaum veränderte Aufnahme von Arginin und Ornithin. Eine ähnliche Funktion von Yhm1p und Ort1p als Proteine, deren Hauptaufgabe der Export von Ornithin zur Argininsynthese aus der mitochondrialen Matrix ist, wird diskutiert.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Allgemeine Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : ein einzelliger Eukaryot .....	1
1.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	1
1.1.2 <i>S. cerevisiae</i> als Modellorganismus .....	1
1.1.3 Kohlenhydratstoffwechsel in Bäckerhefe .....	1
1.2 Mitochondrien .....	5
1.2.1 Besonderheiten von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	6
1.2.2 Die mitochondriale DNA von <i>S. cerevisiae</i> .....	6
1.2.3 Mitochondriale Transportproteine.....	7
1.3 Ziel dieser Arbeit .....	8
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
2.1 Lösungen und Materialien.....	9
2.2 Methoden.....	16
2.2.1 Kultur von <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2.2.2 Kontinuierliche Kultur von <i>S. cerevisiae</i> .....	16
2.2.3 Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	18
2.2.4 Proteinbestimmung .....	18
2.2.5 Messung der Aktivität von Leitenzymen zellulärer Kompartimente .....	19
2.2.6 Messung des Sauerstoffverbrauchs von Mitochondrien.....	19
2.2.7 Aufnahmemessungen mit isolierten Mitochondrien.....	20
2.2.7.1 Pyruvattransport .....	20
2.2.7.2 Arginin- und Ornithintransport.....	21
2.2.7.3 Tryptophantransport .....	22
2.2.7.4 Rechnergestützte Auswertung der Transportmessungen.....	22
2.2.8 Selektive Permeabilisierung von <i>S. cerevisiae</i> mit Nystatin .....	22
2.2.9 Enzymatische Bestimmungen .....	23
2.2.9.1 Glucose.....	23
2.2.9.2 Ethanol.....	23
2.2.9.3 Lactat.....	24
2.2.10 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen .....	24
2.2.11 Deletion von <i>ORT1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.2.12 Entfernen des <i>kanMX</i> -Moduls aus dem Genom von transformierten Hefezellen .....	25
2.2.13 Nachweis der Deletion von <i>ORT1</i> durch Colony PCR.....	25
2.2.14 HPLC-Analyse von Aminosäuren .....	26
2.2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	27
2.2.16 Western Blot.....	27
2.2.17 Herstellung von mitochondrialen Extrakten zur Bestimmung von Magnesium .....	29
2.2.18 Bestimmung des Gehalts an Mg, Ca und Fe in Extrakten aus Hefemitochondrien mittels ICP-MS .....	29
2.2.19 Bestimmung des Gehalts an Mg in Extrakten aus Hefemitochondrien mittels AAS.....	29

<b>3 Die Mch-Proteinfamilie und mitochondrialer Monocarboxylattransport .....</b>	<b>30</b>
3.1 Einleitung .....	30
3.2 Ergebnisse .....	30
3.2.1 Präparation von Mitochondrien aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
3.2.2 Nachweis der mitochondrialen Lokalisation von Mch3p .....	31
3.2.3 Kinetik der Pyruvatveratmung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> K26 WT, <i>mch3</i> und <i>mch1-5</i> .....	32
3.2.4 Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> K26 WT und <i>mch1-5</i> im Schüttelkolben mit verschiedenen Kohlenstoffquellen .....	35
3.2.5 Glucoselimitierte kontinuierliche Kultur von <i>S. cerevisiae</i> K26 WT, <i>mch3</i> und <i>mch1-5</i> .....	36
3.2.6 Mitochondriale Atmung mit verschiedenen Hemmstoffen .....	37
3.2.7 Pyruvattransport von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> K26 WT und <i>mch1-5</i> .....	41
3.2.8 Lactatbestimmung aus <i>S. cerevisiae</i> K26 WT und <i>mch1-5</i> .....	44
3.3 Diskussion .....	45
<b>4 Andere Funktionen der Mch-Proteinfamilie .....</b>	<b>48</b>
4.1 Einleitung .....	48
4.2 Ergebnisse .....	49
4.2.1 Wachstum von Hefezellen mit Tryptophan als N-Quelle .....	49
4.2.2 Transport von Tryptophan .....	50
4.2.3 Aminosäuren in WT-, <i>mch3</i> - und <i>mch1-5</i> -Zellen .....	52
4.3 Diskussion .....	53
<b>5 Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie .....</b>	<b>56</b>
5.1 Einleitung .....	56
5.2 Ergebnisse .....	57
5.2.1 Atmungsaktivität von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> mit Deletionen von YDL198c, YER053c, YOR222w und YPL134c .....	57
5.2.2 Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> mit Deletionen von YDL198c, YER053c, YOR222w und YPL134c .....	58
5.2.3 Die Einzeldelentionsmutante K1 $\Delta$ YDL198c ( <i>yhm1</i> ) .....	61
5.2.4 Welche Aminosäuren fördern das Wachstum von <i>S. cerevisiae yhm1</i> auf Minimalmedium mit Glucose? .....	62
5.2.5 Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> K1 WT und <i>yhm1</i> in verschiedenen Medien .....	65
5.2.6 Veratmung von Prolin und Glutamat durch Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> K1 WT und <i>yhm1</i> .....	67
5.2.7 Deletion von ORT1 in WT- und <i>yhm1</i> -Hefezellen. ....	68
5.2.8 Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> K1 WT, <i>yhm1</i> , <i>ort1</i> und <i>yhm1/ort1</i> in verschiedenen Medien .....	69
5.2.9 Wachstum von BY-Zellen .....	71
5.2.10 Aminosäuregehalt von <i>S. cerevisiae</i> K1 WT, <i>yhm1</i> , <i>ort1</i> und <i>yhm1/ort1</i> .....	74
5.2.11 Aufnahmemessungen an isolierten Mitochondrien .....	77
5.2.11.1 Glutamataufnahme .....	77
5.2.11.2 Aufnahme von Arginin und Ornithin .....	77
5.2.12 Bestimmung des Magnesiumgehalts von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> K1 WT und <i>yhm1</i> .....	79

---

5.3 Diskussion.....	81
5.3.1 Ist der mitochondriale Pyruvatcarrier ein MCF-Mitglied? .....	81
5.3.2 Was ist die Funktion von Yhm1p? .....	82
5.3.3 Warum konnte Argininzugabe bei Wachstum mit Ethanol oder Prolin das Fehlen von Yhm1p nicht ausgleichen? .....	83
5.3.4 Warum konnte Argininzugabe bei Wachstum mit Glucose und Ammonium das Fehlen von Yhm1p ausgleichen? .....	85
5.3.5 Warum hatten die BY <i>yhm1</i> - und <i>ort1</i> -Zellen einen anderen Phänotyp als die entsprechenden K1 <i>yhm1</i> - und <i>ort1</i> -Zellen? .....	89
5.3.6 Ist Yhm1p ein Magnesiumtransporter? .....	90
5.3.7 Was ist die Funktion von Yhm1p? .....	91
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>
<b>7 Literatur .....</b>	<b>94</b>

### Abkürzungsverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Drei-Buchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie alle physikalischen Größen entsprechen den IUPAC-Empfehlungen.

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ald-DH	Aldehyddehydrogenase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Serumalbumin vom Rind
C4HC	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fmoc	(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl
FOA	5-Fluoro-Orotsäure
frz.	französisch
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	„doppelt destilliertes“ Wasser, hier aus Millipore-Filteranlage
HA	Hämagglutinin
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LDH	Lactatdehydrogenase
Lsg.	Lösung
MCF	Mitochondriale Carrierfamilie
MES	2-(4-Morpholinyl)-ethansulfonsäure
N-Quelle	Stickstoffquelle
OD	Optische Dichte
OPA	o-Phthalaldehyd
ORF	<i>open reading frame</i> = offenes Leseraster
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PTFE	Polytetrafluorethylen, „Teflon“
RCF	<i>respiratory control factor</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Grundgesamtheits-Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
T	Temperatur
TM	Trockenmasse
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro ml
v/v	Volumeneinheiten pro Volumeneinheit
Vol.	Volumenäquivalent(e)
w/v	Gewichtseinheiten pro Volumeneinheit
WT	Wildtyp

# 1 Allgemeine Einleitung

## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae*: ein einzelliger Eukaryot

### 1.1.1 Wirtschaftliche Bedeutung von *S. cerevisiae*

Hefen sind seit Jahrtausenden vom Menschen unwissentlich als Quelle für Nahrung und Getränke kultiviert worden. In einem ägyptischen Grab von etwa 2400 v.Chr. sind die ersten Beschreibungen von Backen und Brauen gefunden worden. Im Jahre 1680 entdeckte Antonie van Leeuwenhoek Hefezellen unter seinem Mikroskop, fast zweihundert Jahre später zeigte Louis Pasteur 1876 die essentielle Rolle lebender Zellen bei der alkoholischen Gärung, zwölf Jahre später isolierte dann Emil Christian Hansen in der Carlsberg Brauerei in Kopenhagen erstmals Bierhefe und hielt sie in reiner Kultur (zur Übersicht Rose und Harrison 1987). Inzwischen werden jährlich 2,5 Millionen Tonnen von *Saccharomyces* produziert (Schmitt und Schröder-Köhne 2000). *S. cerevisiae* ist ein Hemiascomycet, das heißt ein einzelliger sporenbildender Pilz ohne Fruchtkörper und Hyphen (zur Übersicht Kreger-van Rij 1987). Alle Hefestämme, die heutzutage zum Backen und Brauen verwendet werden, gehören zu dieser Art. Frühere Differenzierungen zwischen den Arten *S. cerevisiae*, *S. uvarum* und *S. carlsbergensis* sind von Taxonomen inzwischen aufgehoben worden, alle Bäcker- und Bierhefen gehören der Art *S. cerevisiae* an.

### 1.1.2 *S. cerevisiae* als Modellorganismus

Lange Zeit waren Bakterien, vor allem *Escherichia coli*, der Hauptforschungsgegenstand in der Zellbiologie. Sie wurden vor allem wegen ihrer leichten Kultivierbarkeit als Modellorganismus eingesetzt. Seit den 80er Jahren hat es einen Schwenk zu den Hefen, vor allem zu *S. cerevisiae*, gegeben. Dafür gibt es mehrere Gründe: erstens vereint Bäckerhefe den Vorteil der leichten Kultivierbarkeit mit dem Vorteil, ein Eukaryot zu sein, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass Informationen über Prozesse in Hefe auch für höhere Organismen relevant sind, ist größer. So spielen zum Beispiel die Homologe von Proteinen, die zuerst in Hefe identifiziert wurden, im Menschen eine ähnliche Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus, bei Sekretion und Prozessierung von Prohormonen (zur Übersicht siehe Brenner 2000). Zweitens war schon in den 80er Jahren auch die Hefegenetik so weit fortgeschritten, dass Gene kartiert, mutiert und heterolog in Hefe exprimiert werden konnten. 1996 wurde dann die erste vollständige Genomsequenz eines Bäckerhefestammes veröffentlicht (Goffeau *et al.* 1996). *S. cerevisiae* hat etwa 6000 Gene auf 16 Chromosomen. Bäckerhefe kann stabil im diploiden oder haploiden Zustand existieren. In haploiden Zustand hat sie einen von zwei Paarungstypen, die  $a$  und  $\alpha$  genannt werden. Haploide Zellen haben einen Durchmesser von ca. 4  $\mu\text{m}$ , ein Volumen von ca. 70  $\mu\text{m}^3$  und enthalten etwa 6 pg Protein/Zelle. Diploide Zellen sind etwa 1,5 mal so groß (Sherman 1991).

### 1.1.3 Kohlenhydratstoffwechsel in Bäckerhefe

Die zwei Hauptwege des Kohlenhydratabbaus von *S. cerevisiae* kann man an den zwei Hauptanwendungen des Organismus verdeutlichen: Backen und Brauen. Beim Backen ist die Produktion von  $\text{CO}_2$  die wichtigste Aufgabe der Hefe, eine möglichst

vollständige Oxidation der Kohlenhydrate führt zur höchsten CO<sub>2</sub>-Produktion. Beim Brauen ist dagegen Ethanol das erwünschte Produkt des Kohlenhydratstoffwechsels, die Zucker sollen also möglichst nur unvollständig oxidiert werden. Je nach Art und Konzentration der im Medium vorhandenen Kohlenstoffquellen bevorzugt *S. cerevisiae* bei Kultur im Labor einen dieser beiden Stoffwechselwege. Wenn die Glucosekonzentration im Medium hoch ist, oder wenn kein Sauerstoff verfügbar ist, wird die Glucose zu Ethanol abgebaut, dieser Prozess wird Fermentation genannt. Charakteristisch für fermentatives Wachstum sind hohe spezifische Wachstumsraten und eine niedrige Energieausbeute (Tabelle 1). Wenn keine fermentierbaren Substrate mehr vorhanden sind, oxidiert Hefe Ethanol vollständig zu CO<sub>2</sub> und Wasser. Hierbei ist die Energieausbeute hoch, die Zellen können aber nur langsam wachsen (Tabelle 1).

Bei Kultur im Schüttelkolben mit Glucose als Kohlenstoffquelle werden beide Stoffwechselwege benutzt. Zuerst wachsen die Zellen, nach einer anfänglichen langsamen *lag*-Phase, mit hoher Geschwindigkeit, wobei sich die Zellzahl exponentiell erhöht. In dieser Phase wird die im Medium vorhandene Glucose zu Ethanol abgebaut. Wenn keine Glucose mehr vorhanden ist, folgt eine zweite *lag*-Phase, in der die Zellen ihre Enzymausstattung umstellen, um während der Fermentation entstandenes Ethanol verwerten zu können. Nach dieser Phase, die auch *diauxic shift* genannt wird, folgt eine zweite Phase exponentiellen Wachstums mit einer niedrigeren Wachstumsrate, in der Ethanol veratmet wird. Obwohl während der ersten Wachstumsphase zwei Nährstoffe im Medium vorhanden sind (Glucose und das Fermentationsprodukt Ethanol), wird der erste Nährstoff erst vollständig aufgebraucht, bevor mit der Verwertung des zweiten begonnen wird. Deswegen wird dieses Verhalten *Diauxie* genannt (griech. *auxein*: wachsen, Monod 1949).

In glucoselimitierter aerober kontinuierlicher Kultur kann ein dritter Hauptstoffwechselweg für Glucose beobachtet werden. Bei geringer Wachstumsgeschwindigkeit mit Restglucosekonzentrationen im Medium unter 50 mg/l wird die Glucose direkt vollständig zu CO<sub>2</sub> und Wasser oxidiert. Die Biomasseausbeute ist in diesem Fall ähnlich hoch wie bei der Oxidation von Ethanol (Tabelle 1). Bei höheren Wachstumsgeschwindigkeiten findet, wohl wegen der begrenzten Kapazität der Atmungskette (Postma *et al.* 1989), auch alkoholische Fermentation statt. Dieser Effekt wird Crabtree-Effekt genannt. Jones und Kompala (1999) haben ein Modell entwickelt, nach dem die drei beschriebenen Wege des Glucose- und Ethanolabbaus in Hefe miteinander konkurrieren, um zu jeder Zeit die Wachstumsrate zu maximieren. Damit lassen sich sowohl das diauxische Wachstum bei Kultur im Schüttelkolben als auch das Verhalten in kontinuierlicher Kultur, inklusive der spontan auftretenden Oszillationen (Parulekar *et al.* 1986), erklären.

Tabelle 1: Kennzahlen zum Wachstum von *S. cerevisiae* auf Glucose und Ethanol (aus Jones & Kompala 1999)

	maximale spezifische Wachstumsrate	Biomasseausbeute [g/g Substrat]	respiratorischer Quotient (CO <sub>2</sub> -Produktion/O <sub>2</sub> -Verbrauch)	Energieausbeute
Fermentation von Glucose	0,45 h <sup>-1</sup>	0,15	> 1	2 mol ATP / mol Glucose
vollständige Oxidation von Ethanol	0,2 h <sup>-1</sup>	0,65	ca. 0,7	6-11 mol ATP / mol Ethanol
vollständige Oxidation von Glucose	0,25 h <sup>-1</sup>	0,5	ca. 1	16-28 mol ATP / mol Glucose

### Pyruvat als zentrale Verbindung des Kohlenhydratstoffwechsels

Abbildung 1 zeigt eine vereinfachte Übersicht über den Kohlenhydratkatabolismus von *S. cerevisiae*. Die zentrale Rolle von Pyruvat wird sofort grafisch deutlich, im Folgenden wird auf die einzelnen Abbauege eingegangen (zur Übersicht Pronk *et al.* 1996).

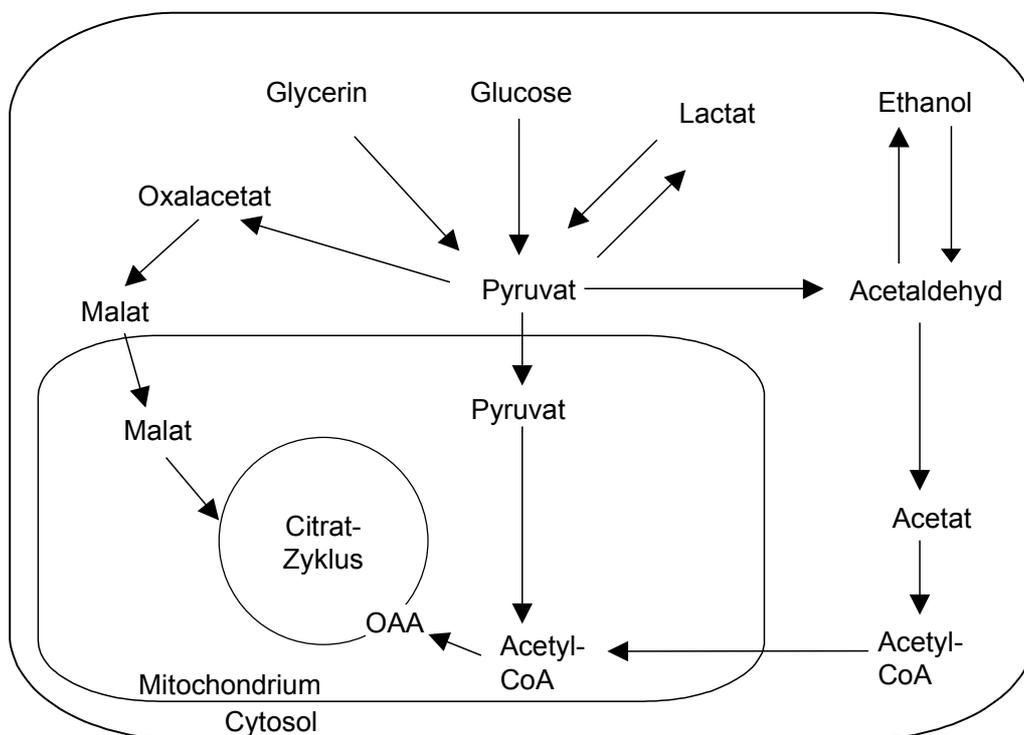


Abbildung 1: Kohlenhydratstoffwechsel in *S. cerevisiae*, schematischer Ausschnitt, Pfeile sind nicht als Reaktionspfeile zu verstehen. OAA: Oxalacetat. Verändert nach Pronk *et al.* 1996.

### Glucose

Glucose wird über spezifische Transporter, z.B. Mitglieder der Hxt-Familie (Wieczorke *et al.* 1999), in die Zelle aufgenommen. Bei fermentativem Wachstum wird die Glucose in der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt, das dann von der, bei Bäckerhefe im Cytosol lokalisierten, Pyruvatdecarboxylase zu Acetaldehyd decarboxyliert wird. Acetaldehyd wird dann im Cytosol oder in den Mitochondrien von einer Alkoholdehydrogenase zu Ethanol reduziert. Bei der vollständigen Oxidation von Glucose, wie sie hauptsächlich bei langsamem Wachstum in glucoselimitierter aerober kontinuierlicher Kultur vorkommt (s.o.), wird Pyruvat in die Mitochondrien transportiert, dort von der Pyruvatdehydrogenase oxidativ decarboxyliert, und das entstehende Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) wird im Citratzyklus vollständig oxidiert.

### Ethanol

Ethanol kann frei durch die zellulären Membranen diffundieren und wird in der Zelle von der Alkoholdehydrogenase Adh2p zu Acetaldehyd oxidiert. Das Acetaldehyd kann nicht zu Pyruvat carboxyliert werden, da die Reaktion energetisch zu ungünstig ist. Stattdessen wird das Acetaldehyd von einer Aldehyddehydrogenase zu Acetat umgewandelt, aus Acetat wird dann Acetyl-CoA, katalysiert von einer Acetyl-CoA-Synthase. Die Umwandlung von Acetaldehyd zu Acetat kann im Cytosol oder in den Mitochondrien stattfinden, in beiden Kompartimenten sind Aldehyddehydrogenasen gefunden worden (zitiert in Bakker *et al.* 2001), eine mitochondriale Lokalisation von Acs1p, einem Isoenzym der cytoplasmatischen Acetyl-CoA-Synthase Acs2p, wird diskutiert. Das entstehende Acetyl-CoA wird in den Mitochondrien im Citratzyklus vollständig oxidiert, ein Teil wird jedoch auch für die Fettsäuresynthese im Cytosol gebraucht.

### Lactat

Nach Aufnahme in die Zelle, z.B. über den Monocarboxylattransporter Jen1p (Makuc *et al.* 2001) muss Lactat wie Ethanol oxidativ verstoffwechselt werden. Lactat wird von der Lactatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert, das in die Mitochondrien transportiert wird um dort von der Pyruvatdehydrogenase oxidativ decarboxyliert zu werden. Das entstehende Acetyl-CoA wird im Citratzyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert. Die katabole Lactatdehydrogenase ist bei Bäckerhefe ein mitochondriales Enzym. Es ist an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und überträgt die Elektronen auf Cytochrom c (zur Übersicht de Vries & Marres 1987).

### Glycerin

Glycerin wird nach Aufnahme in die Zelle z.B. durch die Plasmamembrantransporter Gup1p und Gup2p (Holst *et al.* 2000) unter ATP-Verbrauch von Glycerin-Kinase (Gut1p) und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (Gut2p) zu Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt, das dann von den Enzymen der Glykolyse zu Pyruvat umgewandelt wird. Bis zur Stufe des Pyruvats wird netto ein ATP-Molekül pro Molekül Glycerin verbraucht, bei Reduzierung des Pyruvats zu Ethanol oder Lactat zum Recycling der Reduktionsäquivalente würde die Zelle also keine Energie gewinnen, sondern verlieren. Das Pyruvat muss deshalb in die Mitochondrien transportiert werden, um dort von der Pyruvatdehydrogenase oxidativ decarboxyliert zu werden, und dann als Acetyl-CoA im Citratzyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert zu werden. Auch die katabole Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase Gut2p ist bei Bäckerhefe an

der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Sie überträgt die Elektronen auf Ubichinon (zur Übersicht Rönnow & Kielland-Brandt 1993).

### Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels

Die Aktivitäten der für die oben beschriebenen Stoffwechselwege verantwortlichen Proteine werden von Bäckerhefe streng reguliert. Der bekannteste Regelmechanismus ist die Glucoserepression, auch Katabolitrepression genannt (zur Übersicht Gancedo 1998). Wenn die Glucosekonzentration im Medium über einem Schwellenwert liegt, wird die Transkription einer Reihe von Genen reprimiert. Dabei handelt es sich um Transportproteine für andere Kohlenhydrate sowie um Enzyme des respiratorischen Stoffwechsels, Bestandteile der Atmungskette und des Citratzyklus. Auch die Menge an mitochondrialer DNA wird verringert (Cho *et al.* 2001). Viele Elemente, die für diesen Effekt verantwortlich sind, sind bekannt, sie bestehen u.a. aus den regulatorischen Proteinen Snf1p und Snf4p und dem transkriptionellen Inhibitor Mig1p. Glucose induziert auch die Expression einer Reihe von Genen, z.B. von Hexosetransportern der Plasmamembran, hierbei spielen die Glucosesensoren Snf3p und Rgt1p in der Plasmamembran eine Rolle (zur Übersicht Johnston 1999).

## 1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen, deren Hauptaufgabe die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) ist. Der Prozess der oxidativen Phosphorylierung koppelt die Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Reduktionsäquivalente mit dem Aufbau eines elektrochemischen Potentials über der inneren Mitochondrienmembran, das zur ATP-Synthese aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat genutzt wird. Das Mitochondrium wird durch zwei Membranen in vier Kompartimente geteilt: die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innenmembran und die Matrix. In und an der Innenmembran sind die Komponenten der Elektronentransportkette und die ATP-Synthase lokalisiert, die für die ATP-Synthese verantwortlich sind. In der Matrix befinden sich die löslichen Enzyme des Citratzyklus. Außerdem finden hier Schritte in der Biosynthese einiger Aminosäuren, Nukleotide, Vitamine, von Häm und Fe/S-Zentren statt. In vielen Eukaryoten, jedoch nicht in Bäckerhefe, finden der Fettsäureabbau durch  $\beta$ -Oxidation sowie der Harnstoffzyklus im Mitochondrium statt.

In den letzten Jahren haben die Mitochondrien wieder verstärkte Aufmerksamkeit erfahren, weil sie zentral an der Regulation des programmierten Zelltods, der Apoptose, beteiligt sind (zur Übersicht Desagher & Martinou 2000). Apoptose ist für die normale Entwicklung von Geweben unerlässlich, eine falsche Regulation wird mit einer Reihe von Krankheiten wie Krebs und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Interessant ist, dass ein mit Apoptose vergleichbarer Prozess auch in Bäckerhefe zu beobachten ist (zur Übersicht Fröhlich & Madeo 2000). Es wird diskutiert, dass die Apoptose ursprünglich als Reaktion auf oxidativen Stress von einzelligen Organismen entwickelt wurde. Eine schnelle Zerstörung eines oxidativ geschädigten Einzellers überlässt den Nachbarn, die normalerweise Klone der geschädigten Zelle sind, und damit dem Genom der geschädigten Zelle selbst, mehr Nährstoffe. Höhere Organismen könnten diesen Prozess dann später in der Evolution ausgenutzt haben, und produzieren jetzt absichtlich reaktive Sauerstoffspezies, um die Apoptose auszulösen. Bäckerhefe als Modellorganismus, in dem Apoptose

induziert werden kann, könnte zu einem leicht handhabbaren Werkzeug der Apoptoseforschung werden.

### 1.2.1 Besonderheiten von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die leichte genetische Manipulierbarkeit von Bäckerhefe, sowie ihre Fähigkeit, auch ohne funktionelle Mitochondrien leben zu können (s.u.), macht sie zu einem beliebten Modellorganismus gerade für Forschungen an Mitochondrien. Dabei sind jedoch einige Besonderheiten zu beachten, die sie von Säugerzellen, an denen Mitochondrienforschung ursprünglich vor allem stattfand, unterscheiden.

Die Lokalisation einer Reihe von Enzymen ist bei Bäckerhefe und Säugerzellen unterschiedlich. So sind die Enzyme des Harnstoffzyklus, der bei Säugern und auch Hefen wie *Neurospora crassa* teilweise in den Mitochondrien stattfindet, bei Bäckerhefe ausschließlich im Cytosol lokalisiert. Die sogenannte  $\beta$ -Oxidation, also der Abbau von Fettsäuren, ist bei Säugern in Mitochondrien, bei Bäckerhefe in Peroxisomen lokalisiert.

Die Atmungskette von Bäckerhefe weist ebenfalls Besonderheiten auf. Ein Komplex I fehlt, die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktasen der inneren Mitochondrienmembran katalysieren keinen Protonentransport. Im Gegensatz zu Mitochondrien aus Säugerzellen, die NADH nur an der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran oxidieren können, kann Bäckerhefe, wie Pflanzen, NADH sowohl auf der Matrixseite mit Ndi1p, als auch an der Intermembranraum-Seite mit Nde1p und Nde2p oxidieren.

Bäckerhefe ist ein fakultativ anaerober Organismus. Das heißt, dass sie in völliger Abwesenheit von Sauerstoff wachsen kann, wenn Sterole und ungesättigte Fettsäuren im Medium vorhanden sind (zur Übersicht Henry 1982). Außerdem kann sie auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen auch ohne mitochondriale DNA (mtDNA) wachsen (zur Übersicht Chen & Clark-Walker 1999). Auf Agarplatten sind Kolonien von Hefezellen ohne mtDNA kleiner als solche mit mtDNA, solche Mutanten werden deshalb *petite* (frz. klein) genannt. Hefen, die ohne mtDNA wachsen können, sind *petite*-positiv (z.B. *S. cerevisiae*), solche, die ohne mtDNA nicht wachsen können, sind *petite*-negativ (z.B. *Schizosaccharomyces pombe*).

### 1.2.2 Die mitochondriale DNA von *S. cerevisiae*

Die Mitochondrien sind die einzigen Zellorganellen neben dem Zellkern, die DNA enthalten. Diese DNA ist ein Überbleibsel des Genoms des symbiotischen  $\alpha$ -Proteobakteriums, das bei der Entstehung der Eukaryoten zum Vorfahren der Mitochondrien wurde (zur Übersicht Gray *et al.* 2001). Die erste vollständige Sequenz einer mitochondrialen DNA aus Bäckerhefe (Foury *et al.* 1998) enthält Gene für 8 Proteine, 24 tRNAs und die RNA-Komponenten der mitochondrialen Ribosomen. Die 8 Proteine sind 3 Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase, 3 Untereinheiten der ATP-Synthase, Apocytochrom b und das ribosomale Protein Var1p. Die Sequenz enthält noch eine Reihe uncharakterisierter offener Leseraster (ORFs, *open reading frames*) sowie introncodierte Endonukleasen, die für das korrekte Ablesen der mtDNA nötig sind. Insgesamt sind in der Hefeproteindatenbank YPD (<http://www.proteome.com>, Hodges *et al.* 1999) 18 mitochondrial codierte (putative) Proteine aufgeführt (Stand Mai 2002).

Die veröffentlichte Sequenz der mtDNA von *S. cerevisiae* hat eine Länge von 85,6 kb, die mtDNA liegt aber in den Hefemitochondrien in mehreren Kopien als DNA-Protein-Komplexe vor, die als Nukleoide bezeichnet werden. Die Zahl der Genom-Äquivalente ist größer als die Zahl der mit DNA-spezifischen Farbstoffen visualisierbaren Nukleoide, sowohl die Genom-Menge als auch die Zahl der Nukleoide werden von den zur Verfügung stehenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen reguliert (McAlpine *et al.* 2000). Ein wichtiges DNA-bindendes Protein in den Mitochondrien ist das kernkodierte Histon Abf2p, das für Rekombination, Segregation und Regulierung der Menge der mtDNA, z.B. bei Glucoserepression, wichtig ist (Zelenaya-Troitskaya *et al.* 1998, McAlpine *et al.* 2000, Cho *et al.* 2001).

### 1.2.3 Mitochondriale Transportproteine

Während die äußere Mitochondrienmembran aufgrund des porenbildenden Porins permeabel für Stoffe bis zu einer Größe von etwa 5-6 kDa ist (Colombini 1979), stellt die innere Mitochondrienmembran eine Permeabilitätsbarriere dar. Um die biochemischen Prozesse in der mitochondrialen Matrix mit denen des Rests der Zelle zu verbinden, müssen viele verschiedene Stoffe kontrolliert über diese Permeabilitätsbarriere transportiert werden. Dieser Transport wird von spezifischen Transportproteinen in der inneren Mitochondrienmembran katalysiert. Beispiele für wichtige Transportreaktionen sind der Austausch von ADP und ATP sowie der Transport von Phosphat in die Matrix.

Die ersten Transportproteine der inneren Mitochondrienmembran, deren Sequenz beschrieben wurde, konnten alle in eine Proteinfamilie eingeordnet werden, die mitochondriale Carrierfamilie (MCF) genannt wurde (Aquila *et al.* 1987). Die Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie haben eine Größe von etwa 32 kDa, ihre aus Hydropathieplots abgeleitete Sekundärstruktur weist drei ähnliche Abschnitte von je etwa 100 Aminosäuren auf, die jeweils ein Paar transmembraner Helices bilden (Walker & Runswick 1993). Jeder der drei Abschnitte enthält das Signaturmotiv *Pro X Glu/Asp X X Lys X Arg* (Belenkiy *et al.* 2000). Die funktionelle Einheit der MCF-Mitglieder ist wahrscheinlich ein Dimer (zur Übersicht Klingenberg & Nelson 1995, Krämer 1996).

Im vollständig sequenzierten Genom von *S. cerevisiae* wurden 35 Sequenzen gefunden, die sich in die MCF einordnen ließen (El Moulaj *et al.* 1997, Nelson *et al.* 1998). 12 dieser ORFs war zu Beginn dieser Arbeit eine Transportfunktion in der inneren Mitochondrienmembran zugeordnet worden. Diese 12 Proteine transportieren Phosphat, ATP und ADP, Ornithin, Carnitin und Acylcarnitin, Tricarboxylate, Dicarboxylate, Oxalacetat, Sulfat und Flavin (Adrian *et al.* 1986, Lawson & Douglas 1988, Kolarov *et al.* 1990, Phelps *et al.* 1991, Kaplan *et al.* 1995, Wu *et al.* 1995, Crabeel *et al.* 1996, Palmieri *et al.* 1997b, Palmieri *et al.* 1999). Ein MCF-Mitglied, Ant1p, wurde in Peroxisomen lokalisiert und ist für den Adeninnukleotidtransport über die Peroxisomenmembran verantwortlich (van Roermund *et al.* 2001, Palmieri *et al.* 2001).

Viele weitere Transportreaktionen in der inneren Mitochondrienmembran sind biochemisch nachgewiesen oder werden aus theoretischen Gründen gefordert (zur Übersicht Nelson *et al.* 1998). Die diese Reaktionen katalysierenden Proteine sind jedoch noch nicht identifiziert.

Im Rahmen des Projektes EUROFAN zur Funktionszuweisung von Proteinen aus *S. cerevisiae* hatten Dr. Eckhard Boles und Judita Makuc von der Universität Düs-

seldorf Hinweise darauf gefunden, dass ein Mitglied der Mch-Proteinfamilie, Mch3p, mitochondrial lokalisiert war. Die Mch-Proteinfamilie (*monocarboxylate permease homologs*) in *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus fünf Proteinen mit Homologie zu den in der Plasmamembran lokalisierten Monocarboxylattransportern MCT aus Säugerzellen (André, 1995; Nelissen *et al.*, 1997; Yeast Transport Protein database (YTPdb) (<http://alize.ulb.ac.be/YTPdb/>)). Die Homologie zu Monocarboxylattransportern legte nahe, auch den Mch-Proteinen eine Monocarboxylattransportfunktion zuzuweisen. Hier kam bei Mch3p insbesondere der Transport von Pyruvat in die mitochondriale Matrix in Frage, der biochemisch nachgewiesen ist (Papa und Paradies 1974). Das für den Transport verantwortliche Protein ist jedoch noch nicht identifiziert worden (Nalecz *et al.* 1991). *MCH3* codiert für ein Protein mit 673 Aminosäureresten und einem Molekulargewicht von 73,8 kDa. Computergestützte Sekundärstrukturvorhersagen sagen für alle Mch-Proteine 10-12 Transmembranhelices voraus. Bei einer Funktionszuweisung von Mch3p als mitochondrialer Transporter wäre nicht nur eines der wichtigsten mitochondrialen Transportproteine identifiziert, Mch3p wäre auch das erste mitochondriale Transportprotein mit nachgewiesener Funktion, das nicht zur mitochondrialen Carrierfamilie MCF gehört, deren Mitglieder strukturell völlig anders aussehen. Während dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu drei mitochondrial lokalisierten ABC-Transportern veröffentlicht, die ebenfalls keine Verwandtschaft mit der MCF aufweisen: Atm1p ist nötig für den Transport von im Mitochondrium gebildeten Fe/S-Zentren ins Cytosol (Kispal *et al.* 1999), Mdl1p und Mdl2p exportieren Peptide ins Cytosol (Young *et al.* 2001).

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Der mitochondriale Pyruvatcarrier ist trotz seiner zentralen Bedeutung für den Stoffwechsel der Zelle noch in keinem Organismus identifiziert worden. Obwohl alle Mitglieder der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) in Bäckerhefe bekannt sind, konnte bisher keinem dieser Proteine die Funktion als Pyruvatcarrier zugewiesen werden. Eine Erklärung dafür wäre, dass noch andere Proteine als Transportproteine in der inneren Mitochondrienmembran aktiv sind, die nicht zur MCF gehören.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, das den Pyruvattransport über die innere Mitochondrienmembran katalysierende Protein in Bäckerhefe zu identifizieren. Kooperationspartner hatten Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisation des nicht zur MCF gehörenden Proteins Mch3p in Hefe erhalten. Dieses Protein ist homolog zu Monocarboxylattransportern in der Plasmamembran von Säugetieren. Zunächst sollte der Vermutung nachgegangen werden, Mch3p sei der mitochondriale Pyruvatcarrier. Dazu sollten Hefezellen, denen das Gen *MCH3* fehlte, mit Wildtypzellen verglichen werden. Neben der Charakterisierung des Wachstumsverhaltens sollte die Pyruvataufnahme intakter isolierter Mitochondrien aus den Zellen verglichen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Lösungen und Materialien

#### Hefestämme

Bezeichnung	Genotyp	Quelle
"K1"=CEN.PK113-5D	<i>MATa ura3-52 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2</i>	K.-D. Entian, Frankfurt am Main
"K26"=CEN.PK113-13D	<i>MATα ura3-52 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2</i>	K.-D. Entian, Frankfurt am Main
<i>yhm1</i>	K1 YDL198c:: <i>kanMX4</i>	E. Boles, Düsseldorf
<i>ort1</i>	K1 YOR130c:: <i>kanMX4</i>	diese Arbeit
<i>yhm1/ort1</i>	K1 <i>yhm1</i> ohne <i>kanMX4</i> , YOR130c:: <i>kanMX4</i>	diese Arbeit
ERDL	K1 YER053c:: <i>URA3</i> YDL198c:: <i>kanMX4</i>	E. Boles, Düsseldorf
PLOR	K26 YPL134c:: <i>URA3</i> YOR222w:: <i>kanMX4</i>	E. Boles, Düsseldorf
4xD	aus Kreuzung ERDL x PLOR: YER053c:: <i>URA3</i> YDL198c:: <i>kanMX4</i> YPL134c:: <i>URA3</i> YOR222w:: <i>kanMX4</i>	E. Boles, Düsseldorf
"BY"= BY 4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> stammt ab von FY2 (Winston <i>et al.</i> 1995), der von S288C abstammt.	Brachmann <i>et al.</i> 1998, bezogen von EUROSCARF, Frankfurt am Main
BY <i>yhm1</i>	BY 4741 YDL198c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF, Frankfurt am Main
BY <i>ort1</i>	BY 4741 YOR130c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF, Frankfurt am Main
<i>mch3</i>	K26 YNL125c:: <i>kanMX4lacZ</i>	E. Boles, Düsseldorf
<i>mch1-5</i>	K26 ΔYDL054c ΔYKL221w ΔYNL125c ΔYOL119c ΔYOR306c	E. Boles, Düsseldorf
W303-1A	<i>MATa leu2-3/112 ura3-1 trp161 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal0</i>	de Jesus Ferreira <i>et al.</i> (2001)

## Oligonukleotide

ORT1

5'-TTT AAC CTA TAG GGA ACT CAA ATT CTG GAA GGT CAA CGT ATA ATG  
TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC-3'

ORT2

5'-TGT CTA TCA ATG TTA CAT ACT TGC TTA TTA CAC GAT TTA TTG TAT GCA  
TAG GCC ACT AGT GGA TCT G-3'

ORT4

5'-CCA ATC CTA TTC CAT CCA TGC-3'

ORT5

5'-GCG TAC CAA AGA CTC TAA CAG-3'

kanFW

5'-CCT CGA CAT CAT CTG CCC-3'

kanRE

5'-GGA TGT ATG GGC TAA ATG-3'

## Chemikalien und Lösungen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), ICN Biomedicals (Eschwege), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen und hatten *p.a.* Qualität.

Zymolyase	Zymolyase 20T aus <i>Arthrobacter luteus</i> , Kirin Brewery, Japan. 20000 u/g. 1 unit Zymolyase 20T lysiert Zellen mit 3 mg Trockengewicht. Die Zymolyase wurde frisch eingewogen und in 1,2 M Sorbit, 20 mM KPi suspendiert.
Mitochondrienpuffer	0,3 M Saccharose, 1 mM EGTA, 5 mM MOPS, 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1% BSA fettsäurefrei, pH 7,4 (mit KOH eingestellt)
SEM-Puffer	250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,4 (mit KOH eingestellt)
Isolationspuffer IPB	0,6 M Mannit, 2 mM EGTA, 10 mM Saccharose, 10 mM Tris, pH 6,8 oder 8,0 (mit HCl eingestellt)
Transportpuffer TPB	0,6 M Mannit, 5 mM EGTA, 10 mM Tris, 10 mM Saccharose, 35 mM Aminoxyessigsäure, pH 6,8 oder 8,0 (mit KOH eingestellt)
10x TE-Puffer	100 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0

TL1	100 µl 10xTE, pH 8,0 100 µl 1 M LiOAc pH 7,5 (HAc) 800 µl dest. Wasser Die Lösung wurde frisch hergestellt.
TL2	100 µl 10xTE, pH 8,0 100 µl 1 M LiOAc pH 7,5 (HAc) 800 µl 50% (w/v) PEG 4000 (aus -20 °C) Die Lösung wurde frisch hergestellt.
SS-DNA	10 mg/ml DNA aus Lachssperma (Sigma) in destilliertem Wasser, beschallt.
5x Tris-Glycin-Laufpuffer	15,1 g Tris Base 94 g Glycin 25 ml 20% SDS mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.
6x Probenpuffer (SDS-Stop)	125 mM Tris pH 6,8, 3 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin, 9% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
14%ige Trenngel-Lösung (5 ml)	2,25 ml H <sub>2</sub> O 1,4 ml ProSieve 50 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 50µl 10% (w/v) SDS-Lösung 50 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) 2 µl TEMED
5%ige Sammelgel-Lösung (2 ml)	1,5 ml H <sub>2</sub> O 200 µl ProSieve 50 260 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,8 20 µl 10% (w/v) SDS-Lösung 20 µl 10% APS 2 µl TEMED
α-Cyano-4-hydroxymzimtsäure (C4HC)	der Feststoff (Sigma, Deisenhofen) wurde unter Zugabe von 5 M KOH in Wasser gelöst in einer Konzentration von 1 mol/l. Der pH-Wert betrug dann 9,1, die K <sup>+</sup> -Konzentration betrug 170 mM.
C4HC-Kontrolllösung	170 mM KCl pH 9,1 eingestellt mit 5 M KOH
Aminooxyacetat	(Aminooxy)essigsäure-Hemihydrochlorid (Sigma, Deisenhofen) wurde in einer Konzentration von 0,35 M in Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.
Silikonöl, d <sub>r</sub> ≈1,04 g/cm <sup>3</sup>	AR 200 (Wacker Chemie, München)
Silikonöl, d <sub>r</sub> ≈1,06 g/cm <sup>3</sup>	AP 100 (Wacker Chemie, München)

## Material und Methoden

---

Nystatin-Stammlösung

1 mg/ml Nystatin (w/v) in DMSO

Glasfaserfilter

Glass Fibre Discs Type F (Cat. No. APFF02500, Millipore, Eschborn)

### Radiochemikalien:

<sup>14</sup>C-Pyruvat

[2-<sup>14</sup>C]-Pyruvat Natriumsalz (NEN, Boston, USA) als Feststoff, in 5 mM MOPS. Lagerung bei -20°C.

<sup>14</sup>C-Citrat

[1,5-<sup>14</sup>C]-Zitronensäure (Amersham Biosciences, Freiburg) in wässriger Lösung mit 2% Ethanol.

<sup>14</sup>C-Arginin

L-[U-<sup>14</sup>C]-Argininhydrochlorid (Amersham Pharmacia, Freiburg, CFB63, Batch 76LO1), 11,8 GBq/mmol, 1,85 MBq/ml

<sup>14</sup>C-Ornithin

L-[1-<sup>14</sup>C]-Ornithinhydrochlorid (Moravek Biochemicals, USA, MC-161, Lot 142-173-053), 2,0 GBq/mmol, 3,7 MBq/ml

<sup>14</sup>C-Glutamat

L-[U-<sup>14</sup>C]-Glutaminsäure (Amersham Pharmacia CFB65, Batch 81), 9,4 GBq/mmol, 1,85 MBq/ml

<sup>14</sup>C-Phenylalanin

L-[U-<sup>14</sup>C]-Phenylalanin (Amersham Pharmacia), 17,2 GBq/mmol, 1,85 MBq/ml

<sup>14</sup>C-Prolin

L-[U-<sup>14</sup>C]-Prolin (Moravek Biochemicals, USA, MC-263, Lot 125-093-246), 9,1 GBq/mmol, 37 kBq/ml

<sup>14</sup>C-Tryptophan

L-[Side Chain-3-<sup>14</sup>C]-Tryptophan (NEN, NEC-367, Lot 3409160), 2,1 GBq/mmol, 740 kBq/ml

<sup>3</sup>H-Saccharose

[6,6'(n)-<sup>3</sup>H]-Saccharose (Amersham Pharmacia TRA332, Batch 54), 548 GBq/mmol, 37 MBq/ml

### Kulturmedien für Hefezellen

1000x Vitaminlösung f. CBS-Medium

0,05 g D-Biotin  
1 g Ca-D(+)-Panthothenat  
1 g Nicotinsäure  
25 g myo-Inositol  
1 g Thiaminhydrochlorid  
1 g Pyridoxinhydrochlorid  
1 g p-Aminobenzoessäure  
in 1 l H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C für bis zu 3 Monate.

1000x Spurenelemente f. CBS-Medium	<p>15 g EDTA-Na<sub>2</sub>            4,5 g ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O            1,0 g MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O            0,3 g CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O            0,3 g CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O            0,4 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O            4,5 g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O            3,0 g FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O            1,0 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>            0,1 g KI            in 1 l H<sub>2</sub>O dd., autoklaviert, dunkle Lagerung            bei RT, geöffnete Flaschen bei 4°C.</p>
CBS-Medium (Verduyn <i>et al.</i> 1997)	<p>100 ml (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 g/l            20 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 g/l            20 ml MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 25 g/l            1 ml Spurenelemente 1000x            1 ml Vitamine 1000x            20 ml Uracil 1g/l (bei Uracil-Auxotrophie)            auf 800 ml aufgefüllt mit H<sub>2</sub>O dd. Nach Zu-            gabe der Kohlenstoffquelle mit H<sub>2</sub>O dd auf 1 l            aufgefüllt. Alle Zutaten wurden separat auto-            klaviert.</p>
CBS2D	CBS-Medium mit 2% (w/v) Glucose als C-Quelle
CBS2E	CBS-Medium mit 2 % (v/v) Ethanol als C-Quelle
YPD-Medium	<p>10 g Bacto Yeast Extract (BD Biosciences)            20 g Bacto-Pepton (BD Biosciences)            wurden mit Wasser auf 900 ml aufgefüllt,            gelöst und autoklaviert.            100 ml 20%ige (w/v) Glucose, autoklaviert,            wurde zugeben.            2% (w/v) Glucose, ca. 0,1 mol/l</p>
YPAD-Medium	YPD-Medium mit 100 mg/l Adeninsulfat
YPG-Medium	<p>8 g Bacto Yeast Extract (BD Biosciences)            16 g Bacto Pepton (BD Biosciences)            27,9 ml Glycerin 86%            wurden mit Wasser auf 800 ml aufgefüllt und            autoklaviert.            3% (v/v) Glycerin, ca. 0,4 mol/l</p>
YPE-Medium	<p>8 g Bacto Yeast Extract (BD Biosciences)            16 g Bacto Pepton (BD Biosciences)            wurden mit Wasser auf 720 ml aufgefüllt und            autoklaviert. Dann wurden 16 ml EtOH abs.            und 64 ml autoklaviertes H<sub>2</sub>O dd. zugege-            ben.            2% (v/v) Ethanol = 14 g / l, ca. 0,25 mol/l</p>

## Material und Methoden

---

YPL-Medium	8 g Bacto Yeast Extract (BD Biosciences) 16 g Bacto Pepton (BD Biosciences) wurden mit Wasser auf 720 ml aufgefüllt und autoklaviert. 25 ml Milchsäure 64% pH 5 (mit KOH eingestellt) und 55 ml autoklaviertes H <sub>2</sub> O dd. wurden anschließend zugegeben. 2% (v/v) Milchsäure, ca. 0,28 mol/l
Aminosäuremischung für YNB-Medium (Sherman 1991)	Endkonzentrationen: Adeninsulfat 20 mg/l Uracil 20 mg/l L-Tryptophan 20 mg/l L-Histidin-HCl 20 mg/l L-Arginin-HCl 20 mg/l L-Methionin 20 mg/l L-Tyrosin 30 mg/l L-Leucin 30 mg/l L-Isoleucin 30 mg/l L-Lysin-HCl 30 mg/l L-Phenylalanin 50 mg/l L-Glutaminsäure 100 mg/l L-Asparaginsäure 100 mg/l L-Valin 150 mg/l L-Threonin 200 mg/l L-Serin 400 mg/l
YNB2D(-AA)-Medium	1,67 g Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids (BD Biosciences) wurden in 100 ml Wasser gelöst und sterilfiltriert. Von dieser Lösung wurde 1/10 Volumen zu 1/10 Volumen autoklavierter 20%iger (w/v) Glucoselösung und 8/10 Volumen sterilem Wasser gegeben. Bei Auxotrophie wurde der entsprechende Stoff (in der Regel Uracil) zu- gegeben.
YNB2E(-AA)-Medium	1,67 g Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids (BD Biosciences) wurden in 100 ml Wasser gelöst und sterilfiltriert. Von dieser Lösung wurde 1/10 Volumen zu 2/100 Volumen absolutem Ethanol und 88/100 Volumen sterilem Wasser gegeben. Bei Auxotrophie wurde der entsprechende Stoff (in der Regel Uracil) zugegeben.

YNB3G(-AA)-Medium	1,67 g Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids (BD Biosciences) wurden in 100 ml Wasser gelöst und sterilfiltriert. Von dieser Lösung wurde 1/10 Volumen zu 1/10 Volumen autoklavierter 30%iger (v/v) Glycerinlösung und 8/10 Volumen sterilem Wasser gegeben. Bei Auxotrophie wurde der entsprechende Stoff (in der Regel Uracil) zugegeben.
MAD-Medium (Grauslund <i>et al.</i> 1995)	10 g Bernsteinsäure (Succinat) 6 g NaOH 5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1,7 g Bacto yeast nitrogen base w/o amino acids w/o Ammoniumsulfate 22 g Glucose-Monohydrat in 1 l H <sub>2</sub> O, autoklavieren.
MPD-Medium (Grauslund <i>et al.</i> 1995)	wie MAD-Medium, aber statt 5 g/l Ammoniumsulfat 2 g/l Prolin.
MAE-Medium	wie MAD-Medium, aber statt 2% (w/v) Glucose 2% (v/v) Ethanol.
MTD-Medium	wie MAD-Medium, aber statt 5 g/l Ammoniumsulfat 1 g/l Tryptophan

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultur von *S. cerevisiae*

Sofern nicht anders angegeben, wurde die Hefe in Flüssigkultur in Schüttelkolben mit Schikane bei 30 °C und 100-130 U/min kultiviert. Um eine ausreichende Belüftung zu gewährleisten wurden die Kolben nur zu einem Fünftel des Nennvolumens mit Medium befüllt.

Die Lagerung der Zellen erfolgte nach Sherman (1991) auf Agarplatten mit Vollmedium und Glucose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle (C-Quelle).

#### 2.2.1.1 Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit einer Hefekultur

In regelmäßigen Abständen wurde im Photometer (Novaspec II, Pharmacia Biotech) die optische Dichte einer Hefekultur bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt. Die Probe wurde vor der Messung so verdünnt, dass die Absorption mit Wasser als Leerwert zwischen 0,02 und 0,3 lag. Eine Hefekultur mit einer  $OD_{600}$  von 0,1 enthält nach Literaturangaben etwa  $3 \cdot 10^6$  Zellen bzw. 0,045 mg Biotrockenmasse pro ml (Ausubel *et al.* 1997), dieses Verhältnis wurde in Stichproben bestätigt. Aus den erhaltenen Daten wurde eine Wachstumskurve angefertigt. Die Datenpunkte aus dem exponentiellen Teil dieser Wachstumskurve (ermittelt durch halblogarithmische Auftragung) wurden separat aufgetragen und eine exponentielle Wachstumsfunktion mit Hilfe des Computerprogrammes SigmaPlot (SPSS, Erkrath) angepasst. Die Wachstumsfunktion hatte die Form  $y = ae^{bx}$  (y in OD-Einheiten, x in h). In dieser Form ist b die Wachstumsrate  $\mu$  [ $h^{-1}$ ]. Aus Gründen der Anschaulichkeit wurde die Wachstumsrate  $\mu$  in die Verdopplungszeit  $t_D$  umgerechnet:  $t_D = \ln(2)/\mu$ .  $t_D$  ist die Zeit in Stunden, in der sich die Zellzahl einer exponentiell wachsenden Hefekultur einmal verdoppelt.

#### 2.2.1.2 Bestimmung der Trockenmasse

Zur Bestimmung der Trockenmasse einer Hefekultur wurden 2-5 ml Kultur über einen zuvor gewogenen Glasfaserfilter (Millipore, Eschborn) abfiltriert. Die Filter wurden zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in der Mikrowelle 30 min auf Intensitätsstufe "Auftauen" getrocknet. Aus der Differenz des Gewichtes der Filter mit und ohne Zellen wurde die Trockenmasse der Zellen pro Liter Kultur errechnet.

### 2.2.2 Kontinuierliche Kultur von *S. cerevisiae*

#### 2.2.2.1 Grundlagen

Die kontinuierliche Kultur von Zellen bedeutet, dass das Wachstum der Zellen unter *steady state*-Bedingungen stattfindet, das heißt, Wachstum erfolgt mit einer konstanten Rate und in einer konstanten Umgebung. Faktoren wie pH-Wert, Nährstoffkonzentration, Konzentration von Stoffwechselprodukten und Sauerstoff, die sich während des Wachstums in einer *batch*-Kultur unvermeidlich ändern, werden in der kontinuierlichen Kultur konstant gehalten. Sie können sogar unabhängig voneinander kontrolliert werden.

Ein System zur kontinuierlichen Kultur besteht aus einem Fermenter, in den Nährmedium mit einer konstanten Rate  $f$  einfließt und in dem das Reaktionsvolumen  $v$  durch Abpumpen konstant gehalten wird. Parameter wie pH-Wert und Temperatur werden durch geeignete Regelkreisläufe konstant gehalten. Das Verhältnis zwischen Flussrate und Reaktionsvolumen ist die Verdünnungsrate  $D=f/v$ .  $1/D$  ist die Zeit, in der das Volumen im Fermenter einmal ausgetauscht wurde, gleichbedeutend mit der mittleren Verweilzeit eines Partikels im Fermenter. Nach fünf Verweilzeiten ist theoretisch ein stabiler Zustand erreicht, es herrschen konstante Bedingungen. Die Wachstumsrate  $\mu$  ist dann gleich der Verdünnungsrate  $D$ .

Die ursprünglich von Monod entwickelten Theorie der kontinuierlichen Kultur von Mikroorganismen geht von folgenden Voraussetzungen aus (zur Übersicht Leuenberger 1971):

- a) im Medium sind alle Komponenten bis auf eine im Überfluss vorhanden, diese eine Komponente ist der limitierende Faktor.
- b) die Kultur ist konstant völlig durchmischt, d.h. zutropfendes Medium wird sofort im gesamten Fermentervolumen gleichmäßig verteilt.
- c) das Verhältnis zwischen Wachstumsrate  $\mu$  und der Konzentration  $s$  des limitierenden Substrats wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$\mu = \mu_m \frac{s}{K_s + s}$$

wobei  $\mu_m$  die maximale Wachstumsrate ist. Die Konstante  $K_s$  entspricht der Substratkonzentration, bei der die Wachstumsrate die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht.

Bei langsamen Wachstumsraten, bei denen nicht zusätzlich zur Substratlimitierung noch eine Limitierung des Wachstums durch z.B. Aufnahmesysteme für die Nährstoffe vorliegt, ist die Konzentration des limitierenden Substrats im stationären Zustand nahe Null.

#### 2.2.2.2 Kulturbedingungen

*S. cerevisiae* K26 WT- bzw. *mch3*- oder *mch1-5*-Zellen wurden unter kontinuierlichen Bedingungen in einem Fermenter (Biostat B, B.Braun Biotech, Melsungen) in glucoselimitiertem CBS-Minimalmedium mit Uracil-Zusatz (20 mg/l) bei 30°C und pH 5,0 kultiviert. Die Rührerdrehzahl wurde konstant bei 800 U/min gehalten, die Belüftungsrate war 1,5 l/min (geregelt von Brooks 150/03 mass flow controller), so dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff in der Kultur immer höher als 70% Luftsättigung war. Der pH-Wert wurde durch kontrollierte Zugabe von 2 M KOH auf 5,0 gehalten. Die Verdünnungsrate  $D$  betrug  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .

### 2.2.3 Isolierung von Mitochondrien aus Bäckerhefe

Zur Isolierung von intakten Mitochondrien aus Bäckerhefe wurde ein Protokoll aus dem Labor Pfanner, Freiburg, verwendet, das sich auf eine von Daum *et al.* (1982) entwickelte Methode stützt.

#### 2.2.3.1 Reinigung der Mitochondrien über differentielle Zentrifugation

Ein *Saccharomyces cerevisiae* Stamm wurde im Schüttelkolben bei 30°C unter aeroben Bedingungen in Medium mit einer nicht fermentierbaren C-Quelle angezogen. Die Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD<sub>600</sub> von 1,3-1,6 geerntet (Rotor JLA 16.250, 4 min 4500 U/min RT). Nach Waschen mit destilliertem Wasser (Rotor JLA 16.250, 6 min 4500 U/min RT) wurden das Sediment gewogen (~ 4 g/1,2 l Medium) und in 0,1 M Tris-SO<sub>4</sub> pH 9,4, 10 mM DTT, 2 ml/g Feuchtwicht resuspendiert. Dann wurde die Suspension 10 min bei 30°C leicht geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (JA 25.50 4 min 4000 U/min RT) und einmal mit 10 Vol. 1,2 M Sorbitlösung gewaschen. Die Zellen wurden in 1,2 M Sorbit, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 0,15 g Feuchtwicht/ml resuspendiert. Dann wurde Zymolyase zugegeben (2 mg Zymolyase/g Feuchtwicht) und 30-60 min unter leichtem Schütteln bei 30°C inkubiert. Nach 30 min wurde regelmäßig der Grad der Protoplastierung überprüft. Hierzu wurde eine Probe des Ansatzes 50:2000 in 1,2 M Sorbit bzw. in Wasser verdünnt. Protoplasten lysieren bei der Verdünnung in Wasser, in 1,2 M Sorbit bleiben sie intakt, was im Mikroskop zu beobachten ist. Wenn die Verdünnung in Wasser völlig klar war, wurden die Protoplasten abzentrifugiert (JA 25.50, 4 min 3000 U/min 4°C) und einmal mit 10 Vol. eiskaltem 1,2 M Sorbit gewaschen.

Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Die Protoplasten wurden in 0,6 M Sorbit, 10 mM Tris-Cl pH 7,4, 0,5% BSA, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0,15 g Feuchtwicht/ml resuspendiert und in einem Homogenisator mit Teflonpistill (B.Braun) homogenisiert (13 Kolbenhübe). Nicht protoplastierte Zellen, nicht aufgebrochene Protoplasten und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (JA 25.50, 4 min 4000 U/min 4°C). Die anschließende Zentrifugation des Überstandes mit 12000 U/min für 10 min sedimentierte die Mitochondrien. Das Sediment wurde in SEM-Puffer resuspendiert und für 4 min mit 3500 U/min zentrifugiert. Die gewaschenen Mitochondrien wurden durch Zentrifugation des Überstandes mit 12000 U/min für 10 min sedimentiert. Das Sediment wurde in möglichst wenig SEM-Puffer oder IPB-Puffer aufgenommen (200-500 µl).

### 2.2.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration fand grundsätzlich nach Bradford (1976) statt.

## 2.2.5 Messung der Aktivität von Leitenzymen zellulärer Kompartimente

### 2.2.5.1 Messung der $\alpha$ -Mannosidase-Aktivität (Vakuole)

Die  $\alpha$ -Mannosidase katalysiert die Spaltung von p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid zu p-Nitrophenol und Mannose. p-Nitrophenol kann über seine Absorption bei 400 nm bestimmt werden,  $\epsilon_{440}=16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

300  $\mu\text{l}$  MES/NaOH 0,1 M pH 6,5, 20  $\mu\text{l}$  Triton X-100 10% und 100  $\mu\text{l}$  p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid 4 mM wurden gemischt. Dazu wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Probe gegeben. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Glycin/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,5 M pH 10 gestoppt und 1 min bei 14000 U/min in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Absorption bei 400 nm bestimmt.

### 2.2.5.2 Messung der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität (Mitochondrien)

Reduziertes Cytochrom c wird durch die Cytochrom c-Oxidase oxidiert. Dabei steigt die Absorption des Cytochroms bei 550 nm.  $\epsilon_{550}=21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

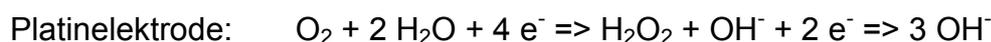
Es wurde ein Ansatz aus 950  $\mu\text{l}$  0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2 und 50  $\mu\text{l}$  1 mM Cytochrom c-Lösung (mit einigen Körnchen Natriumdithionit reduziert) hergestellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Probe gestartet und die Extinktionssteigerung bei 550 nm gemessen.

### 2.2.5.3 Messung der Katalase-Aktivität (Peroxisomen)

Die Katalase in Peroxisomen katalysiert die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Die Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration kann im Photometer bei 240 nm verfolgt werden,  $\epsilon_{240}=40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Bäckerhefe besitzt auch eine cytosolische Katalase, außerdem können auch z.B. mitochondriale Peroxidasen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umsetzen. Die Interpretation der Katalase-Aktivität als Marker für Peroxisomen sollte daher nur mit Vorsicht geschehen.

## 2.2.6 Messung des Sauerstoffverbrauchs von Mitochondrien

Man kann den Sauerstoffgehalt einer Lösung kontinuierlich mit einer Sauerstoffelektrode messen. Dabei handelt es sich um eine elektrochemische Zelle bestehend aus einer Silber- und einer Platinelektrode in einer Elektrolytlösung, z.B. einer 3 M Kaliumchlorid-Lösung. Durch Anlegen einer polarisierenden Spannung wird der Elektrolyt ionisiert, ein Strom fließt durch eine Reihe elektrochemischer Reaktionen:



Durch diese Reaktionen wird Sauerstoff an der Platinelektrode verbraucht, die Stärke des fließenden Stroms hängt linear von der Sauerstoffkonzentration in der Lösung ab und kann daher zur Messung der Sauerstoffkonzentration eingesetzt werden.

Bei den durchgeführten Messungen wurde die *Hansatech S1 oxygen electrode* der Firma Hansatech (Norfolk, England) verwendet. Die Platinelektrode ist bei dieser Apparatur durch eine sauerstoffdurchlässige PTFE-Membran mit der Reaktionskammer verbunden, in der sich die zu messende Lösung befindet. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde das mitgelieferte Computerprogramm *Oxygraph* verwendet.

Zum Messpuffer (Endvolumen 2 ml) wurden die zu untersuchenden Mitochondrien gegeben. Jeweils nach Erreichen einer stabilen Rate des Sauerstoffverbrauchs wurden nacheinander Substrate der Atmung, Hemmstoffe oder Entkoppler zugegeben.

Das Verhältnis der Sauerstoffverbrauchsraten nach Zugabe eines Atmungsketten-Substrats und nach zusätzlicher Zugabe von ADP ist ein Maß für die Kopplung der mitochondrialen Atmung an die ATP-Synthese und damit für die Unversehrtheit der Mitochondrien. Dieses Verhältnis wird Atmungskontrollwert oder RCR (*respiratory control ratio*) genannt (Rickwood *et al.* 1987).

### 2.2.7 Aufnahmemessungen mit isolierten Mitochondrien

#### 2.2.7.1 Messung des Pyruvattransports in Hefemitochondrien

Der Pyruvattransport in Hefemitochondrien wurde durch Messung der Aufnahme von radioaktiv markiertem Pyruvat untersucht. Um einen Abbau des Pyruvats innerhalb der Mitochondrien zu verhindern, wurde die mitochondriale Atmung mit Antimycin A gehemmt. Die zur Aufrechterhaltung eines Membranpotentials nötigen Elektronen wurden durch Tetramethylphenylendiamin (TMPD) geliefert, das durch Ascorbat wieder reduziert wurde. Die Mitochondrien wurden nach Abschluss der Transportreaktion durch Silikonölzentrifugation vom Medium abgetrennt. Bei der Silikonölzentrifugation wird das äußere Medium von den Mitochondrien abgetrennt durch Zentrifugation durch eine Silikonölschicht in eine wässrige Phase. Diese enthielt 0,5% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), das alle Proteine sofort denaturierte und so metabolische Prozesse stoppte.

Ein typisches Experiment sah wie folgt aus. 70 µl frisch präparierte Mitochondrien (0,5 mg Protein) in SEM-Puffer wurden in 652 µl Mitochondrienpuffer (+ Antimycin A 1 µg/ml, TMPD 1,5 µM, Ascorbat 3 mM, <sup>3</sup>H-Saccharose 240 kBq) bei RT 2 min inkubiert. Dieser Inkubationsansatz enthielt außerdem 8,1 µl C4HC-Kontrolllösung. Dann wurden davon 585 µl zu 65 µl [2-<sup>14</sup>C]-Pyruvat (1 mM, 2 kBq/mmol) gegeben (0,1 mM Endkonzentration). Nach Zeitintervallen zwischen 15 und 360 sec wurden 100 µl abgenommen und zum Abstoppen der Reaktion in ein Eppendorfgefäß mit 1 µl α-Cyano-4-hydroxycinnamat (C4HC) (1 M, Endkonzentration 10 mM) gegeben. Bis zum Abschluss einer Messreihe wurden diese Eppendorfgefäße auf Eis gelagert (max. 360 sec). Als "Nullwert" wurden 97,5 µl der Mitochondrien-suspension zu 11 µl [2-<sup>14</sup>C]-Pyruvat (1 mM, 2 kBq/mmol, 0,1 mM Endkonzentration) mit 1,1 µl C4HC (1 M, 10 mM Endkonzentration) gegeben und direkt auf Eis gelagert. Direkt nach Abschluss einer Messreihe wurden je 90 µl der Ansätze in Zentrifugenröhrchen (5,5\*46,7 mm, Beckman Nr. 844110005) mit 30 µl 15% Saccharose / 0,5% SDS und 70 µl Silikonöl (AR 200, d ≈ 1,04 g/cm<sup>3</sup>) gegeben. Die Röhrchen wurden sofort für 2 min in einer Beckman Mikrofuge E bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und dann bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Bei einer "ge-

hemmen" Kinetik erfolgte die zweiminütige Vorinkubation mit C4HC-Lösung statt mit C4HC-Kontrolllösung, zum Abstoppen der Reaktion wurden 100 µl des Ansatzes zu 1 µl C4HC-Kontrolllösung gegeben und davon direkt 90 µl auf ein Silikonölröhrchen gegeben, das sofort zentrifugiert und dann bei -20°C gelagert wurde. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die Röhrchen mit einem Skalpell in der Silikonölschicht durchtrennt, und die untere Spitze wurde umgedreht in einem Eppendorfgefäß aus-zentrifugiert (1 min, 13000 U/min, Hermle Rotor 220.59 V04). Nach Zugabe von 700 µl 1% SDS wurde der Inhalt des Gefäßes durch mehrmaliges Pipettieren ver-mischt, einmal gevortext und 30 min leicht geschüttelt. Nach einer erneuten Zentri-fugation (1 min, 13000 U/min, Hermle Rotor 220.59 V04) zur Sedimentierung des Silikonöls und unlöslicher Bestandteile wurden 500 µl der oberen, wässrigen, Phase abgenommen und die Radioaktivität mit einem  $\beta$ -Counter mit einem Zählprogramm für Doppelmarkierung ( $^3\text{H}$  und  $^{14}\text{C}$ ) gemessen. Die  $^{14}\text{C}$ -counts waren ein Maß für die Menge an  $^{14}\text{C}$ -Pyruvat in den Mitochondrien, die  $^3\text{H}$ -counts waren ein Maß für das Volumen außerhalb der mitochondrialen Matrix, das durch die Silikonölschicht mit-gerissen worden war. Die errechneten Werte für den  $^{14}\text{C}$ -Pyruvatgehalt wurden mit dem Wert für das Außenvolumen korrigiert. Das mitgerissene Volumen betrug bei den Pyruvattransportmessungen 6-8 µl/mg Protein.

#### 2.2.7.2 Arginin- und Ornithintransport

Ein typisches Experiment sah wie folgt aus. Zu 2662 µl Transportpuffer 80% Vol. (Mannit 0,6 M Endkonz., Saccharose 10 mM Endkonz., EGTA 5 mM Endkonz., Aminoxyessigsäure 35 mM Endkonz., Tris-Cl 10 mM Endkonz., pH 8,0 (KOH)), wurden 54,5 µl Antimycin A (200 µg/ml in EtOH), 36,3 µl Oligomycin (300 µg/ml in EtOH), 36,3 µl L-Argininhydrochlorid (10 mM), 11 µl  $^{14}\text{C}$ -Arginin, 10 µl  $^3\text{H}$ -Saccharose und 517 µl H<sub>2</sub>O dd gegeben, davon wurden je 605 µl 30 min bei der Reaktionstempe-ratur inkubiert. Die Transportreaktion wurde gestartet durch Zugabe von 55 µl Mitochondrien in Isolationspuffer IPB pH 6,8 (0,6 M Mannit, 10 mM Saccharose, 2 mM EGTA, 10 mM Tris-Cl). Nach Zeitintervallen zwischen 20 sec und 30 min wurden 100 µl abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen (5,5\*46,7 mm, Beckman Nr. 844110005) mit 30 µl Perchlorsäure 20% und 70 µl Silikonöl (90% (v/v) AR 200, 10% (v/v) AP 100,  $d \approx 1,042 \text{ g/cm}^3$ ) gegeben. Die Röhrchen wurden sofort für 1 min in einer Beckman Mikrofuge E bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und dann bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. Zur weiteren Aufarbeitung wurde das Röhrchen mit einem Skalpell in der Silikonölschicht durchtrennt, und die untere Spitze wurde umgedreht in einem Eppendorfgefäß aus-zentrifugiert (2 min, 13000 U/min, Hermle Rotor 220.59 V04). Nach Zugabe von 750 µl VE-Wasser wurde das Gefäß 10 min beschallt. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 min, 13000 U/min, Hermle Rotor 220.59 V04) zur Sedimentierung des Silikonöls und unlöslicher Bestandteile wurden 650 µl der oberen, wässrigen, Phase abgenommen und die Radioaktivität mit einem  $\beta$ -Counter mit einem Zählprogramm für Doppelmarkierung ( $^3\text{H}$  und  $^{14}\text{C}$ ) gemessen. Die  $^{14}\text{C}$ -counts waren ein Maß für die Menge an  $^{14}\text{C}$ -Arginin in den Mitochondrien, die  $^3\text{H}$ -counts waren ein Maß für das Volumen außerhalb der mitochondrialen Matrix, das durch die Silikonölschicht mitgerissen wurde. Die errechneten Werte für den  $^{14}\text{C}$ -Arginingehalt wurden mit dem Wert für das Außenvolumen korrigiert. Das mitgerissene Volumen betrug bei den Arginintransportmessungen 4-5 µl/mg Protein.

Die Messungen zum Ornithintransport wurden analog durchgeführt.

### 2.2.7.3 Tryptophantransport

Die Messungen wurden durchgeführt wie die Arginintransportmessungen, mit einer  $^{14}\text{C}$ -Tryptophankonzentration von 1 mM. Der Isolationspuffer hatte einen pH-Wert von 6,8, der Messpuffer einen pH-Wert von 8,0.

### 2.2.7.4 Rechnergestützte Auswertung der Transportmessungen

Die anfängliche Aufnahmezeit wurde durch die computergestützte Anpassung einer hyperbolischen Funktion mit der Gleichung  $y=y_0+a(1-e^{-bx})$  an die Messwerte ermittelt. Dabei ist  $(y_0+a)$  das Maximum der Hyperbel, das heißt gleich der maximal akkumulierten Substratmenge und  $a*b$  gleich der Steigung der Hyperbel bei  $y=0$ , das heißt gleich der Anfangsgeschwindigkeit der Transportreaktion  $v_0$ .

### 2.2.8 Selektive Permeabilisierung von *S. cerevisiae* mit Nystatin

Durch Behandlung von Hefezellen mit einer Nystatinkonzentration von 20 mg/l wird selektiv nur die Plasmamembran permeabilisiert (Rolf Hecker, pers. Information). So kann das Cytosol analysiert werden. Wenn man die Menge eines Stoffes im Cytosol von der Menge in der gesamten Zelle abzieht, erhält man die Menge des Stoffes in den Organellen. Da sämtliche andere Organellen verglichen mit der Vakuole ein vernachlässigbares Volumen haben, kann man den organellären Gehalt vieler Stoffe mit dem vakuolären Gehalt gleichsetzen (Messenguy *et al.* 1980). Diese allgemeine Aussage trifft natürlich nur zu, wenn der Stoff nicht in anderen Organellen stark akkumuliert wird.

Zellen aus einer Übernachtskultur wurde in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Zellen wurden zweimal in Wasser gewaschen und dann im halben Ursprungsvolumen PIPES-Puffer (10 mM PIPES-OH pH 6,8) resuspendiert. Zu 980  $\mu\text{l}$  dieser Suspension wurden 20  $\mu\text{l}$  Nystatin-Stammlösung gegeben (20 mg/l Endkonzentration). Als Kontrolle wurde 1 ml der Suspension unbehandelt verwendet. Die Ansätze wurden in Eppendorfgefäßen für 15 min bei 30°C schnell geschüttelt und direkt anschließend bei 4°C für 3 min mit 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Sedimente wurden einmal mit 500  $\mu\text{l}$  PIPES-Puffer gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und bei -20°C gelagert. Für den Gesamtzellaufschluss wurden 750  $\mu\text{l}$  der Suspension zu 750  $\mu\text{l}$  Glasperlen (Durchmesser 425-600  $\mu\text{m}$ ) in ein Eppendorfgefäß gegeben. Dieses wurde 10 min bei 4°C im Laborhomogenisator MSK (B. Braun, Melsungen) geschüttelt. Dann wurden die Zelltrümmer durch eine 3minütige Zentrifugation mit 6000 U/min bei 4 °C sedimentiert und der Überstand bei -20°C gelagert.

#### 2.2.8.1 Weiterbehandlung der Zellextrakte zur Bestimmung von Lactat

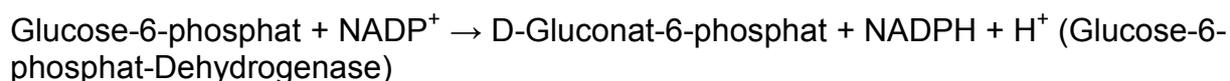
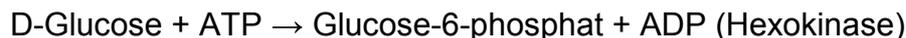
Die Zellextrakte wurden in einer *Speed-Vac* getrocknet, dann in 500  $\mu\text{l}$  PIPES-Puffer gelöst und bei -20°C gelagert.

## 2.2.9 Enzymatische Bestimmungen

Für die Bestimmung von Glucose, Ethanol und Lactat wurden gekoppelte enzymatische Tests verwendet, bei denen die Produktion von NAD(P)H photometrisch verfolgt wurde.

### 2.2.9.1 Glucose

Es wurde die D-Glucose Test-Kombination von Boehringer Mannheim (Nr. 716251) verwendet. Sie nutzt die folgenden Reaktionen:



500  $\mu\text{l}$  Lsg. 1 (Triethanolaminpuffer pH ca. 7,6; NADP 2,4 mg/ml; ATP 5,8 mg/ml;  $\text{MgSO}_4$ ; Stabilisatoren), 100  $\mu\text{l}$  Probelsg. und 900  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  dd wurden in einer Plastik-  
küvette gemischt. Nach ca. 3 min wurde die Extinktion der Lösung bei 340 nm gemessen ( $E_1$ ). Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Suspension 2 (Hexokinase ca. 290 U/ml; Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ca. 150 U/ml). Nach Stillstand der Reaktion (5-10 min) wurde wieder die Extinktion gemessen ( $E_2$ ). Die Extinktionsdifferenz eines Leerwertes ( $\text{H}_2\text{O}$  als Probelsg.) wurde von der Extinktionsdifferenz der Probe abgezogen. Mit dem Extinktionskoeffizienten für NADPH  $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wurde die Menge an umgesetzter Glucose berechnet. Zur Erzielung gut messbarer Extinktionsdifferenzen wurden die Proben so mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, dass ihre Glucosekonzentration 100-130 mg/l betrug.

### 2.2.9.2 Ethanol

Die Bestimmung orientierte sich an der Ethanol Test-Kombination von Boehringer Mannheim (Nr. 176290). Folgende Reaktionen wurden zur Bestimmung von Ethanol ausgenutzt:



500  $\mu\text{l}$  NAD-Lsg. (2,7 mg/ml in 0,1 M  $\text{KP}_i$  pH 9,0), 100  $\mu\text{l}$  Probelsg. und 400  $\mu\text{l}$  Ald-DH-Lsg. (0,2 mg/ml Aldehyd-Dehydrogenase [Sigma A 0826], entspricht etwa 0,6 U/ml) wurden in einer Plastik-  
küvette gemischt. Nach ca. 3 min wurde die Extinktion der Lösung bei 340 nm gemessen ( $E_1$ ). Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  ADH-Suspension (Boehringer Mannheim Nr. 127540, ca. 9000 U/ml). Direkt nach der ADH-Zugabe wurden die Küvetten mit Parafilm verschlossen und geschüttelt. Nach Stillstand der Reaktion (ca. 20 min) wurde wieder die Extinktion gemessen ( $E_2$ ). Die Extinktionsdifferenz eines Leerwertes ( $\text{H}_2\text{O}$  als Probelsg.) wurde von der Extinktionsdifferenz der Probe abgezogen. Mit dem Extinktionskoeffizienten für NADH  $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wurde die Menge an umgesetztem Ethanol berechnet. Zur Erzielung gut messbarer Extinktionsdifferenzen wurden die Proben so mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt, dass ihre Ethanolkonzentration etwa 3-5 mg/l betrug. Das standardmäßig als " $\text{H}_2\text{O}$  dd" verwendete Millipore-Wasser hat

einen Ethanolgehalt von 4 mg/l. Deswegen wurde "Chromasolv G"-Wasser (Riedel-de Haen) verwendet, um die Lösungen, Puffer und Leerwerte anzusetzen.

### 2.2.9.3 Lactat

Es wurde die L-Milchsäure Test-Kombination von Boehringer Mannheim (Nr. 139084) verwendet. Sie nutzt die folgenden Reaktionen:



500 µl Lösung 1 (Glycylglycinpuffer pH ca. 10,0; L-Glutaminsäure ca. 15 mg/ml; Stabilisatoren), 100 µl Lösung 2 (NAD 35 mg/ml), 10 µl Suspension 3 (Glutamat-Pyruvat-Transaminase 1600 U/ml) und 500 µl Probelsg. wurden in einer Plastikküvette gemischt. Nach ca. 5 min wurde die Extinktion der Lösung bei 340 nm gemessen ( $E_1$ ). Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 10 µl Lösung 4 (L-LDH 5500 U/ml). Da die Reaktion auch nach 45 min nicht zum Stillstand kam, sondern nach 20-30 min eine konstante Extinktionszunahme zu beobachten war, wurde  $E_2$  durch Extrapolation der gemessenen Extinktionswerte auf den Zeitpunkt der Zugabe von Lösung 4 ermittelt. Eine reagenzienvermittelte Schleichreaktion ist im Beipackzettel zur Test-Kombination beschrieben. Die Extinktionsdifferenz eines Leerwertes ( $\text{H}_2\text{O}$  als Probelsg.) wurde von der Extinktionsdifferenz der Probe abgezogen. Mit dem Extinktionskoeffizienten für NADH  $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,3 \text{ l mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wurde die Menge an umgesetzter Milchsäure berechnet.

### 2.2.10 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

Zur Transformation von Hefezellen wurde die Lithiumacetat-Methode nach Gietz *et al.* (1992) angewendet, modifiziert von Bruno André (pers. Information Markus Albertsen). 25 ml YPAD-Medium wurden mit einer Übernachtskultur des jeweiligen Hefestammes angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Hefezellen wurden bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 bis 0,7 durch Zentrifugation (5 min 4000 U/min SS34) sedimentiert, zweimal in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, einmal in 0,5 ml TL1 gewaschen und dann in 0,2 ml TL1 resuspendiert. Zu 50 µl dieser Suspension wurden nacheinander gegeben:

5 µl denaturierte (10 min 100°C => Eis) SS-DNA, vortex

ca. 1 µg der zu transformierenden DNA, vortex

300 µl TL2

Die Mischung wurde 30 min bei 30°C kräftig geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension einem 15minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und in 1 ml YPAD resuspendiert. Die Zellen wurden dann 4 h bei 29°C geschüttelt, sedimentiert, in 100 µl  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und auf YPD-Platten mit einem geeigneten Antibiotikum (hier Geneticin 200 µg/ml) ausplattiert.

### 2.2.11 Deletion von *ORT1* in *S. cerevisiae*

Zur Deletion von *ORT1* wurde die Methode nach Güldener *et al.* (1996) verwendet. Diese Methode nutzt das sogenannte *kanMX4*-Modul, ein DNA-Konstrukt, welches aus einem dominanten Kanamycin-Resistenzgen aus *E. coli* (*kan<sup>R</sup>*), verknüpft mit den *TEF*-Promotor- und Terminator-Sequenzen aus *Ashbya gossypii* besteht. Dieses Expressionsmodul wird flankiert von *loxP*-Sequenzen.

Das *loxP-kanMX4-loxP*-Konstrukt befand sich auf dem Vektor pUG6. Mit den Oligonukleotiden *ORT1* und *ORT2* wurde ein PCR-Fragment erzeugt, das aus *loxP-kanMX4-loxP*, flankiert von Sequenzen der 5'- bzw. 3'-untranslatierten Regionen von *ORT1*, bestand. Nach Transformation von Hefezellen (s. 2.2.10) konnte dieses Konstrukt durch homologe Rekombinationsereignisse 5' und 3' des ORF von *ORT1* in das Hefegenom integriert werden und dadurch das vollständige ORF ersetzen. Transformierte Zellen wurden durch Kultur auf YPD-Platten mit Geneticin selektiert.

Die Verwendung eines Resistenz-Markers wie *kanMX* statt eines Auxotrophie-Markers hat den Vorteil, dass der Stoffwechsel der Zelle sehr viel weniger gestört wird. Phänotypische Effekte durch den Einbau des Markergens bleiben so weitgehend ausgeschlossen. Stephen G. Oliver und seine Mitarbeiter haben zum Beispiel den Vorteil des *kanMX*-Resistenzmarkers gegenüber dem häufig verwendeten Auxotrophiemarker *HIS3* gezeigt (Baganz *et al.* 1997).

### 2.2.12 Entfernen des *kanMX4*-Moduls aus dem Genom von transformierten Hefezellen

Zur Entfernung des *kanMX4*-Moduls aus dem Genom von *yhm1*-Zellen wurden die Zellen mit dem Vektor SH47 (Geschenk von E. Boles) transformiert. SH47 enthält das Gen für die *cre*-Rekombinase unter der Kontrolle des *GAL4*-Promotors sowie das *URA3*-Gen. Durch Ausstreichen der transformierten Zellen auf Minimalmedium ohne Uracil wurden die Transformanten selektiert. Vier der Klone wurden nach 3 Tagen auf Minimalmedium mit Galactose umgestrichen. Die Galactose sollte die *cre*-Rekombinase induzieren. Die *cre*-Rekombinase sollte dann die Kanamycin-Resistenzkassette, die von *loxP*-Sequenzen flankiert war, aus dem Hefechromosom schneiden und die beiden offenen Enden des Chromosoms religieren. Der Vektor SH47 wurde anschließend aus den Zellen entfernt, indem die Zellen auf Platten, die Uracil und FOA (5-Fluoro-Orotsäure) enthielten, umgestrichen wurden. FOA wird von dem *URA3*-Genprodukt in eine für die Hefen toxische Verbindung umgewandelt, dieser Selektionsdruck bringt die Hefezellen dazu, den Vektor SH47 mit seinem *URA3*-Gen zu verlieren (Boeke *et al.* 1984). Der Verlust der Kanamycin-Resistenz wurde überprüft, indem die Zellen anschließend parallel auf YPG-Platten und auf YPG/Geneticin-Platten ausgestrichen wurden. Alle Klone wuchsen auf der YPG-Platte, aber nicht auf der YPG/Geneticin-Platte, hatten also die *kanMX4*-Kassette verloren. Da die *yhm1*-Zellen auf Minimalmedium ohne Arginin sehr langsam wuchsen, wurde den Platten immer 20 µg/ml Arginin zugegeben.

### 2.2.13 Nachweis der Deletion von *ORT1* durch *Colony PCR*

In die PCR-Röhrchen wurde nach H<sub>2</sub>Odd, PCR-Puffer, dNTP-Mix und einem Primerpaar je eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes von einer YPD/G418-Platte

gegeben. Nach 15minütigem Erhitzen auf 98 °C und darauf folgender Zugabe der Taq-Polymerase schloss sich eine klassische PCR-Reaktion an.

## 2.2.14 HPLC-Analyse von Aminosäuren

Es wurde ein Verfahren zur Aminosäuretrennung mittels *reversed phase* Chromatographie angewendet. Alle Trennungen wurden auf einem HP 1090 M- (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn) ausgestattet mit dem Fluoreszenzdetektor HP 1046, an Hypersil ODS 5 125 x 4,6 mm Trennsäulen mit 40 x 4,6 mm Vorsäulen (CS-Chromatographieservice, Langerwehe) bei 40 °C durchgeführt. Die Steuerung und Auswertung erfolgte mittels der HP Chemstation Software v 6.03 (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn).

OPA-Reagenz:           0,08 % (w/v) OPA  
                               0,2 % (v/v) 3-Mercaptopropionsäure  
                               2,5 % Kaliumborat pH 10,4  
                               0,003 % (w/v) Brij® 35

*Tabelle 2: Programm des automatischen Probengebers für die Präsäulenderivatisierung mit OPA-Mercaptopropionsäure/Fmoc-Cl. Modifiziert von Hecker (2002) nach Schuster (1988).*

Schritt	Volumen [µl]	Lösung	Zeit [min]/ Aktion
1 Aufziehen	4,5	OPA-Reagenz	-
2 Aufziehen	1-2	Probe	-
3 Aufziehen	0	Wasser	-
4 Aufziehen	4,5	OPA-Reagenz	-
5 Mischen	10-11	-	1 Zyklus
6 Warten	-	-	1
7 Aufziehen	0	Wasser	-
8 Aufziehen	1	Fmoc-Cl	-
9 Mischen	11-12	-	2 Zyklen
10 Warten	-	-	1
11 Injektion/ Injektor mainpass	-	-	1,5
12 Injektor stand by	-	-	-

### 2.2.14.1 OPA-Mercaptopropionsäure/FmocCl-Derivatisierung

Primäre Aminosäuren wurden durch automatische Präsäulenderivatisierung (Tabelle 2) in fluoreszierende Mercaptopropionsäure-substituierte Isoindole überführt, sekundäre Amine wurden in die substituierten Carbamate (Schuster 1988) überführt. Diese Methode erlaubte die Quantifizierung von Prolin zusammen mit den primären Aminosäuren. Die Trennung erfolgte mit dem in Tabelle 3 beschriebenen Gradientenpro-

gramm mit Laufmittel A: 0,02 M Natriumacetat, 0,018 % (v/v) TEA pH 7,2, 0,3 % (v/v) THF und Laufmittel B: Acetonitril/Methanol/0,1 M Natriumacetat pH 7,2 = 2/2/1 (v/v/v). Die quantitative Auswertung erfolgte durch externe Standardisierung, Kontrollen wurden durch Aufstocken von Zellextrakten durchgeführt.

Fmoc-Cl-Reagenz: 0,01 % (w/v) Fmoc-Cl (Fluka, Neu-Ulm) in Acetonitril

*Tabelle 3: Pumpen- und Detektorprogramm für die Trennung von OPA-Mercaptopropionsäure und Fmoc-Cl-derivatisierten Aminosäuren.*

Zeit [min]	Laufmittel B [% (v/v)]	Flussrate [ml/min]	Anregungs-/Detektionswellenlänge [nm]
0	7	0,8	230/ 455
3	10	0,8	230/ 455
3,1	10	1,0	230/ 455
10,2	15	1,0	230/ 455
18,2	50	1,0	230/ 455
20	100	1,0	266/ 310
23	Ende	1,0	-

### 2.2.15 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten mit 95%igem Ethanol wurden diese in die Elektrophoresekammer eingebaut, die Trenngel-Lösung bis ca. 2 cm unter den oberen Glasplattenrand gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach 30 min Polymerisationszeit wurde das Wasser mit Laufpuffer ausgespült, die Platten bis zum Rand mit Sammelgel-Lösung aufgefüllt und ein Taschenformer mit der gewünschten Zahl von Probenaschen eingesteckt. Nach 45 Minuten wurde der Taschenformer entfernt, die entstandenen Taschen mit Laufpuffer ausgespült und die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95°C erhitzt und in die Taschen gefüllt. Dann wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Abschätzung des apparenten Molekulargewichts wurden Standards mit aufgetrennt, die Proteine mit bekanntem Molekulargewicht enthielten.

### 2.2.16 Western Blot

Das vorher mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemisch wird durch Anlegen einer Spannung auf eine PVDF-Membran übertragen. Die auf der Membran fixierten Proteine können dann mit Antikörpern inkubiert werden, die anschließend durch die Bindung von gegen die ersten Antikörper gerichteten Zweitantikörper detektiert werden können, da die Zweitantikörper mit einem Enzym gekoppelt sind, das einen zugegebenen Farbstoff umsetzt und bindet.

## Material und Methoden

---

### 2.2.16.1 Halbtrockentransfer auf eine PVDF-Membran

Blot-Puffer: 10 mM CAPS pH 11 (NaOH), 10% (v/v) Methanol

18 Filterpapiere wurden für 10 min in Blotpuffer eingeweicht, die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol gelegt, dann wurde die Apparatur wie folgt aufgebaut:

Kathode

9 Lagen Filterpapier

SDS-PAGE-Gel

PVDF-Membran

9 Lagen Filterpapier

Anode

Es wurde für 2 h eine Spannung angelegt, die einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  entsprach.

### 2.2.16.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Blockierungs-Lösung: 5 % (w/v) Rinderserumalbumin in 50 mM Tris-Cl pH 7,4, 0,9 % (w/v) NaCl

Waschlösung: 50 mM Tris-Cl pH 7,4, 0,9 % (w/v) NaCl

Lösung A 0,5 g Nitroblau-Tetrazolium (NBT) in 10 ml 70%igem Dimethylformamid, Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

Lösung B 0,25 g Bromchlorindolylphosphat (BCIP, Dinatriumsalz) in 10 ml 50%igem Dimethylformamid, Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$

Lösung C 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM Tris-Cl pH 9,5

Lösung D 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,81 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7,45 g Na-EDTA, in 1 l  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7,2

Die Membran wurde 3x15 min in Blockierungslösung geschwenkt, anschließend 2 h mit dem spezifischen Antikörper inkubiert und dann 3x15 min in Waschlösung gewaschen. Anschließend wurde der zweite Antikörper zugegeben, und erneut 2 h inkubiert. Nach 3x15 min Waschen in Waschlösung wurde die Farbreaktion durchgeführt. Dazu wurden 10 ml Lösung C mit 66  $\mu\text{l}$  Lösung A und 66  $\mu\text{l}$  Lösung B vermischt und auf die Membran gegeben. Die Farbreaktion wurde gestoppt durch Zugabe von Lösung D.

### 2.2.17 Herstellung von mitochondrialen Extrakten zur Bestimmung von Magnesium

Die Isolation der Mitochondrien erfolgte wie in 2.2.3 beschrieben, das Mitochondrienpellet wurde aber nicht in Puffer, sondern in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

Zwei in der Literatur beschriebene Methoden zur Herstellung von Mitochondrienextrakten wurden getestet, mit Verwendung von Digitonin (Gregan *et al.* 2001b) und ohne Digitonin (Gregan *et al.* 2001a). Je 150 µl Mitochondriensuspension (ca. 20-30 µg Protein/µl) wurden entweder mit 150 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> oder 150 µl Digitonin 0,2 mg/ml versetzt und 5 mal 2 min im Wasserbad (Elma Transsonic 570/H) beschallt. Dann wurden 800 µl zugegeben und die Lösungen 10 min mit 34000 U/min im Rotor TLA 120.2 in der Beckman Ultrazentrifuge bei RT zentrifugiert ( $RCF_{avg} = 41000 \text{ xg}$ ). 1 ml des Überstandes wurde abgenommen und bis zur Analyse aufbewahrt. Als Leerprobe wurden 150 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> so behandelt wie die Mitochondriensuspension.

### 2.2.18 Bestimmung des Gehalts an Mg, Ca, Fe, und Co in Extrakten aus Hefemitochondrien mittels ICP-MS

Die mitochondrialen Extrakte wurden im Forschungszentrum Jülich in der Zentralabteilung für Chemische Analysen massenspektrometrisch auf ihren Gehalt an Mg, Ca, Fe und Co untersucht. Unterschiedliche Verdünnungen der Probenlösungen wurden mittels ICP-MS (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionisation) analysiert. Durch Verwendung eines speziellen Probeneintragsystems (Mikrozerstäuber mit Membrandesolvator) war es möglich, die Konzentrationen der Elemente Mg, Ca, Fe und Co in kleinen Probenvolumina (< 1 ml) zu bestimmen. Zur Kalibrierung des Analyseverfahrens wurde die externe Kalibrationsmethode angewandt.

Die Werte der Wasserproben (vgl. 2.2.17) wurden von den Werten der Mitochondrienproben abgezogen, bevor der Gehalt pro mg Protein berechnet wurde.

### 2.2.19 Bestimmung des Gehalts an Mg in Extrakten aus Hefemitochondrien mittels AAS

Die mitochondrialen Extrakte wurden wie in 2.2.17 beschrieben hergestellt. Anschließend wurden je 10 ml Millipore-Wasser zugegeben (Widerstand 18,5 MΩ cm), um das Volumen zu erhöhen. Die Proben wurden von einem Mitarbeiter von Dr. Manfred Thönnessen vom Physikalisch-Geographischen Labor des Geographischen Instituts der Universität zu Köln untersucht. Es wurde das Atomabsorptionsspektrometer FAAS PerkinElmer 3100 mit einer Wellenlänge von 285,2 nm und einer Spaltbreite von 0,7 nm benutzt.

## 3 Die Mch-Proteinfamilie und mitochondrialer Monocarboxylattransport

### 3.1 Einleitung

Die Mch-Proteinfamilie in *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus fünf Proteinen mit Homologie zu den in der Plasmamembran lokalisierten Monocarboxylattransportern MCT aus Säugerzellen (André, 1995; Nelissen *et al.*, 1997; Yeast Transport Protein database (YTPdb) (<http://alize.ulb.ac.be/YTPdb/>)). Im Rahmen des Projektes EUROFAN zur Funktionszuweisung von Proteinen aus *S. cerevisiae* untersuchten Dr. Eckhard Boles und Judita Makuc von der Universität Düsseldorf die intrazelluläre Lokalisation der Mitglieder der Mch-Proteinfamilie durch Expression von Fusionen der Mch-Mitglieder mit dem *green fluorescent protein* (GFP). Alle Fusionsproteine waren in intrazellulären Strukturen lokalisiert, die Verteilung des Fluoreszenzsignals von Mch4p-GFP zeigte, dass dieses Fusionsprotein in der vakuolären Membran lokalisiert war. Ein fluoreszenzmikroskopischer Vergleich der Verteilung des Mch3p-GFP-Fusionsproteins mit der Verteilung von durch DAPI-Färbung sichtbar gemachter DNA zeigte eine weitgehende Übereinstimmung, so dass es sich bei dem Kompartiment, in dem Mch3p-GFP lokalisiert war, wahrscheinlich um die Mitochondrien handelte (Makuc *et al.* 2001). Die Homologie zu den Monocarboxylattransportern der MCT-Familie legte nahe, auch den Mch-Proteinen eine Monocarboxylattransportfunktion zuzuweisen. Hier kam bei Mch3p insbesondere der Transport von Pyruvat in die mitochondriale Matrix in Frage, der biochemisch nachgewiesen ist (Papa und Paradies 1974). Das für den Transport verantwortliche Protein war jedoch noch nicht identifiziert worden (Nalecz *et al.* 1991).

### 3.2 Ergebnisse

#### 3.2.1 Präparation von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

Um der Frage weiter nachgehen zu können, ob Mch3p in Mitochondrien von Hefe lokalisiert ist, wurden Mitochondrien aus Bäckerhefe nach Daum *et al.* (1982) isoliert. Dabei wurde die Zellwand von Hefezellen, die auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (C-Quelle) kultiviert worden waren, enzymatisch abgebaut und die resultierenden Spheroplasten osmotisch lysiert. Die Mitochondrien wurden durch differentielle Zentrifugation isoliert. Die Güte dieser Präparation wurde durch die Messung der Aktivität von Leitenzymen überprüft (Tabelle 4). Cytochrom c-Oxidase diente als Leitenzym für Mitochondrien, Katalase und  $\alpha$ -Mannosidase als Leitenzyme für Peroxisomen bzw. die Vakuole, die beiden Hauptkontaminationen von Mitochondrienpräparationen (Rickwood *et al.* 1987, Yaffe 1991).

## Die Mch-Proteinfamilie und mitochondrialer Monocarboxylattransport

Tabelle 4: Aktivität von Leitenzymen für Mitochondrien (Cytochrom c-Oxidase), Peroxisomen (Katalase) und Vakuole ( $\alpha$ -Mannosidase) der Fraktionen aufeinanderfolgender Reinigungsschritte bei der Isolation von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*. Ausbeute bezogen auf die Gesamtaktivität des Spheroplastenextraktes, Anreicherung auf die spezifische Aktivität.

Fraktion	Cytochrom c-Oxidase		Katalase		$\alpha$ -Mannosidase	
	Ausbeute [%]	Anreicherung	Ausbeute [%]	Anreicherung	Ausbeute [%]	Anreicherung
Spheroplastenextrakt	100	x 1	100	x 1	100	x 1
Organellen + Cytosol	90	x 0,9	54	x 0,53	36	x 0,5
Mitochondrien	80	x 11	20	x 2,9	9,6	x 1,6
1. Waschschrift	65	x 17	0,3	x 0,08	9,6	x 5,1
2. Waschschrift	35	x 42	0,1	x 0,12	0,007	x 2,0

Insgesamt wurde eine etwa 40fache Anreicherung der Mitochondrien mit einer Ausbeute von etwa 35% erreicht. Die Waschschriffe führten zu einer zusätzlichen Anreicherung der spezifischen Cytochrom c-Oxidase-Aktivität etwa um den Faktor 4, Katalase- und  $\alpha$ -Mannosidase-Aktivität wurden dagegen nicht weiter angereichert.

### 3.2.2 Nachweis der mitochondrialen Lokalisation von Mch3p

In der Arbeitsgruppe Boles war auf der Basis des Hefestamms CEN.PK113-13D ("K26") ein Stamm hergestellt worden, der statt des nativen Mch3p eine Mch3p-3xHA-*tag*-Fusion exprimiert. Das HA-*tag* besteht aus 9 Aminosäuren, in diesem Fall wurde die codierende DNA-Sequenz dreimal hintereinander in das Genom integriert, um die Erkennung durch einen Anti-HA-Antikörper zu verbessern. Die Chance einer Falschlokalisation des Fusionsproteins durch Anhängen des *tags* ist bei den insgesamt 27 Aminosäuren, die Mch3p C-terminal dadurch zusätzlich trug, viel geringer als bei der Fusion mit dem 28 kDa großen GFP. Das Protein wurde von seinem nativen Promotor aus exprimiert, auch Artefakte durch Überexpression (Ausubel *et al.* 1997) waren also ausgeschlossen. Aus diesem Hefestamm wurden nach Kultur in YPG-Medium (2% (v/v) Glycerin als C-Quelle) Mitochondrien isoliert und verschiedene Präparationsfraktionen wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an Mch3p-3xHA-*tag* untersucht (Abbildung 2).

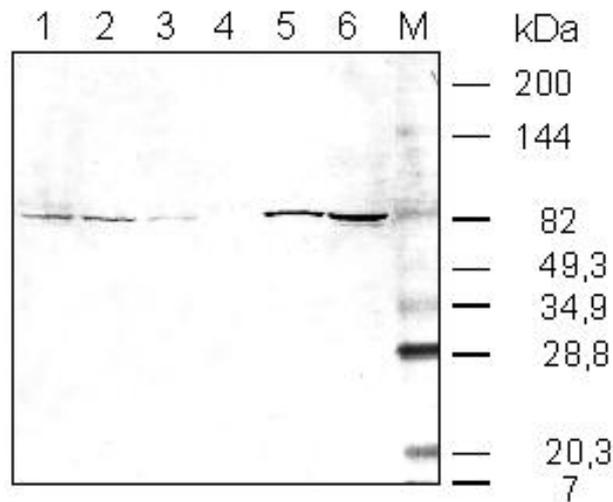


Abbildung 2: Western Blot verschiedener Fraktionen der Mitochondrienisolation aus Bäckerhefe, je 10 µg Protein. 1. Antikörper: Anti-HA Y-11 (Santa Cruz, CA, USA) 25 ng/ml, 2. Antikörper: AP conjugated Anti Rabbit IgG (Sigma) 1:10000. 1: Spheroplasten, 2: Trümmer lysierter Spheroplasten und unlysierte Spheroplasten, 3: Überstand lysierter Spheroplasten, 4: Überstand Hochgeschwindigkeitszentrifugation (entspricht Cytoplasma), 5: Mitochondrien, 6: gewaschene Mitochondrien

Mit dem Anti-HA-Antikörper konnte ein Protein der erwarteten Größe (theoretisches Molekulargewicht von Mch3p mit 3x HA-tag = 79,3 kDa) in allen Fraktionen außer in der Cytoplasma-Fraktion detektiert werden. Der Anteil des Proteins am Gesamtprotein war in der Mitochondrienfraktion höher als in den Fraktionen mit ganzen Protoplasten, der Waschschritt, der speziell die Mitochondrien noch einmal anreichte (vgl. Tabelle 4), erhöhte den relativen Anteil des Proteins noch einmal. Hiermit war gezeigt, dass das Mch3p-3xHA-Fusionsprotein in den Mitochondrien lokalisiert ist, was die von Judita Makuc mit der GFP-Fusion erhaltenen Daten bestätigte. Die Bestätigung der mitochondrialen Lokalisation von Mch3p war die Grundlage für weitere Experimente, in denen untersucht werden sollte, ob Mch3p ein mitochondrialer Pyruvatcarrier ist.

### 3.2.3 Kinetik der Pyruvatveratmung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K26 WT, *mch3* und *mch1-5*

Isolierte Mitochondrien können in Anwesenheit von Malat extern zugesetztes Pyruvat oxidieren (z.B. Averet *et al.* 1998). Diese Oxidation findet in der Matrix durch die Pyruvatdehydrogenase statt, das Pyruvat muss also über die innere Mitochondrienmembran transportiert werden. Wegen der Ähnlichkeit der Mch-Proteine zu Monocarboxylat-Transportern von Säugerzellen wurde eine Funktion von Mch3p als mitochondrialer Pyruvattransporter vermutet. Wenn *MCH3* für den mitochondrialen Pyruvatcarrier codiert, müsste ein Fehlen dieser Transportaktivität die Pyruvatoxidation der Mitochondrien beeinflussen. Deswegen wurde die Abhängigkeit des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs von der externen Pyruvatkonzentration bei Mitochondrien aus WT-, *mch3*-Zellen (*MCH3::kanMX4lacZ*) und *mch1-5*-Zellen (alle 5 *MCH*-Gene nacheinander durch *kanMX4* ersetzt, Makuc *et al.* 2001) bestimmt. Für die Messungen wurde eine Sauerstoffelektrode eingesetzt, die die Sauerstoffkonzentration im Inkubationsmedium misst. Isolierte Mitochondrien zeigen ohne Substratzugabe eine geringe Atmungsrate, die vom Gehalt an internem Substrat

abhängt. Zugabe von Pyruvat allein erhöht diese Atmungsrate nicht, da die mitochondriale Pyruvatdehydrogenase von ihrem Produkt Acetyl-CoA gehemmt wird (zur Übersicht siehe Pronk *et al.* 1996). Die Zugabe von Malat führt zur Bildung von Oxalacetat (katalysiert durch die Malatdehydrogenase), das mit dem Acetyl-CoA zu Citrat reagiert (katalysiert durch die Citratsynthase) und so die *Feedback*-Hemmung verhindert.

Hefezellen wurden in YPG-Medium kultiviert, um die Expression des Pyruvatcarriers zu fördern (vgl. Einleitung). Zu frisch präparierten Mitochondrien wurde zunächst 0,5 mM Malat gegeben und die Atmungsrate der Mitochondrien gemessen. Dann wurden verschiedene Konzentrationen von Pyruvat zugegeben und die Erhöhung der Sauerstoffverbrauchsrate ermittelt (Abbildung 3). Die Abhängigkeit des pyruvatabhängigen Sauerstoffverbrauchs von der Pyruvatkonzentration folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik, so dass die  $K_M$ - und  $V_{max}$ -Werte ermittelt werden konnten (Tabelle 5). Die ermittelten Werte stimmten gut mit dem veröffentlichten Wert von „etwa 0,3 mM“ (van Urk *et al.* 1989) überein. Signifikante Unterschiede zwischen WT, *mch3*- und *mch1-5*-Mitochondrien waren nicht zu sehen.

Diese Daten sprechen gegen eine Funktion eines Mitglieds der Mch-Proteinfamilie als wichtiger Pyruvattransporter. Der  $K_M$ -Wert des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes für Pyruvat ist 0,2-0,6 mM (Kresze & Ronft 1981), also ähnlich wie der  $K_M$ -Wert der Pyruvatoxidation isolierter Mitochondrien. Eine verringerte Pyruvattransportaktivität der Mitochondrien sollte also limitierend auf die Oxidation wirken und die kinetischen Parameter der Oxidation beeinflussen.

Tabelle 5: Kinetische Parameter der pyruvatabhängigen Atmung isolierter Mitochondrien in Anwesenheit von 0,5 mM Malat. Die Parameter wurden durch Anpassen einer Michaelis-Menten-Kurve an die Daten aus Abbildung 3 mit dem Programm SigmaPlot erhalten. Werte  $\pm$  SD der mathematischen Anpassung.

Stamm	$K_M$ [mmol/l]	$V_{max}$ [nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> (mg Protein) <sup>-1</sup> ]
K26 WT	0,28 $\pm$ 0,03	74 $\pm$ 3
<i>mch3</i>	0,41 $\pm$ 0,13	86 $\pm$ 13
<i>mch1-5</i>	0,35 $\pm$ 0,09	105 $\pm$ 11

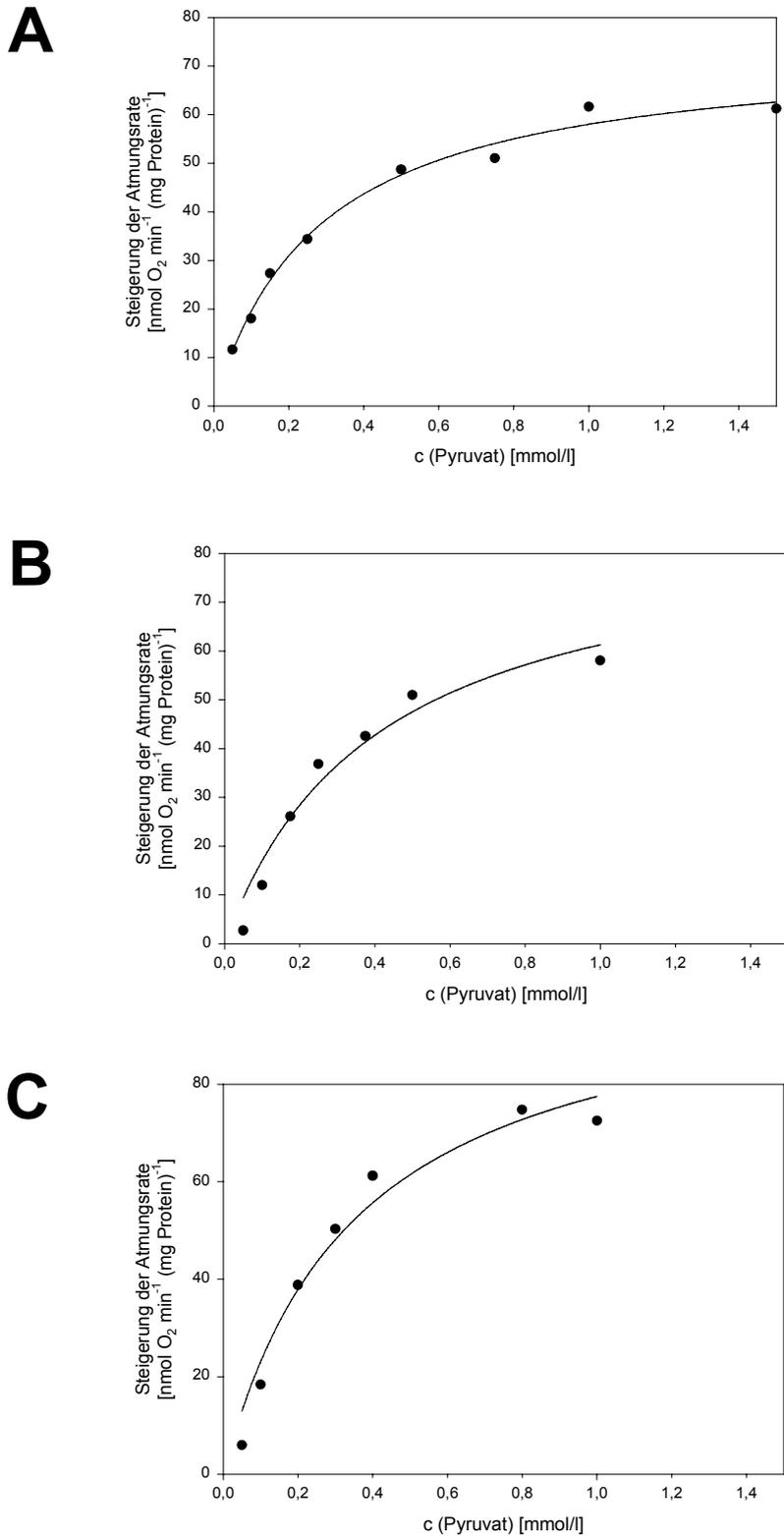


Abbildung 3: Pyruvatoxidation isolierter Mitochondrien aus *S. cerevisiae* als Funktion der Pyruvatkonzentration bei einer festen Malatkonzentration von 0,5 mM. Angegeben ist die Differenz der Atmungsraten vor und nach Zugabe des Pyruvats. Die Mitochondrien wurden isoliert aus A: K26 WT, B: mch3, C: mch1-5.

### 3.2.4 Wachstum von *S. cerevisiae* K26 WT und *mch1-5* im Schüttelkolben mit verschiedenen Kohlenstoffquellen

Falls die Mch-Proteine eine Rolle im Monocarboxylatstoffwechsel der Hefezellen spielen sollten, könnte das einen Einfluss auf die Verarbeitung von Kohlenstoffquellen durch die Zelle haben (vgl. Einleitung). Aus diesem Grund wurde das Wachstum von WT- und *mch1-5*-Zellen auf verschiedenen C-Quellen untersucht. *S. cerevisiae* K26 WT und *mch1-5* wurden in Vollmedium kultiviert. Die *mch1-5*-Zellen zeigten beim Wachstum mit Glucose, Glycerin, Lactose oder Ethanol als C-Quelle keinen Unterschied in der nach 26 h erreichten Biomasse verglichen mit dem Wildtyp (s. Abbildung 4). Beim Wachstum auf Glycerin wurde eine deutlich geringere Biomasse erreicht als beim Wachstum auf den anderen drei Kohlenstoffquellen.

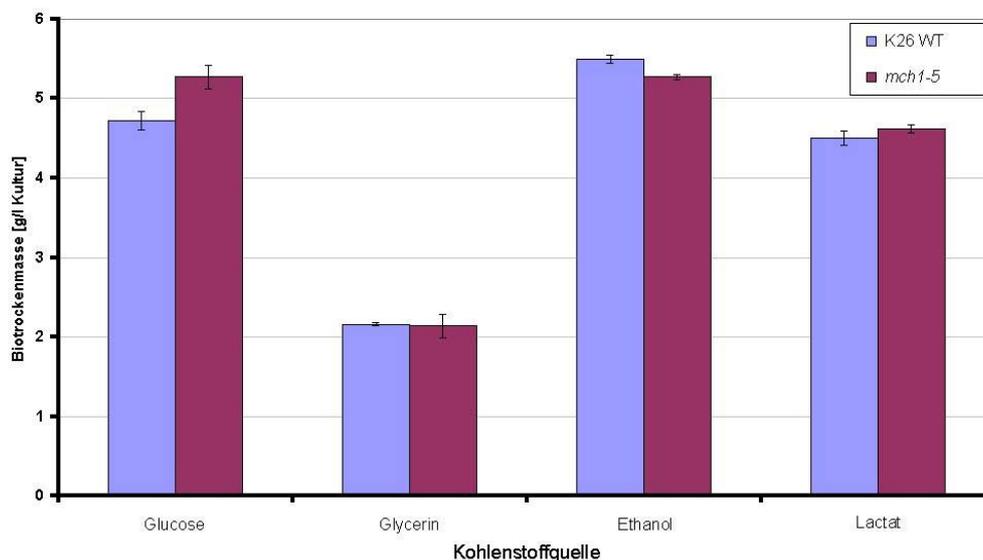


Abbildung 4: Biotrockenmasse von *S. cerevisiae* K26 WT und *mch1-5* nach 26 h Wachstum in Vollmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen: 2% (w/v) Glucose), 3% (v/v) Glycerin, 2% (v/v) Ethanol, 2% (v/v) Milchsäure. Angeimpft wurde mit einer Biotrockenmasse von 0,11 g/l. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung aus der gleichen Kultur an.

Auch im Verbrauch der C-Quellen Glucose und Ethanol zeigten sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *mch1-5*-Zellen (s. Tabelle 6). Beim Wachstum auf Glucose wurden gleiche Mengen Ethanol produziert. Neue Hinweise auf eine Rolle der Mch-Proteine im Monocarboxylatstoffwechsel von Bäckerhefe waren auch mit diesen Experimenten nicht gefunden worden.

Tabelle 6: Konzentration von Glucose und Ethanol im Kulturmedium von *S. cerevisiae* K26 nach 26 h Wachstum im Schüttelkolben, angeimpft mit 0,11 g/l Biotrockenmasse, erreichte Biotrockenmasse ca. 5 g/l.

Kulturmedium	YPD		YPE
Stamm	Glucose [g/l]	Ethanol [g/l]	Ethanol [g/l]
K26 WT	0,1 ± 0,1	4,2 ± 0,2	7,6 ± 0,2
<i>mch1-5</i>	0,23 ± 0,05	4,1 ± 0,2	7,8 ± 0,2

### 3.2.5 Glucoselimitierte kontinuierliche Kultur von *S. cerevisiae* K26 WT, *mch3* und *mch1-5*

In der Hefemutante T23C (*PDA1::Tn5ble*) ist das Gen für die E1 $\alpha$ -Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes deletiert. Diese *pda1*-Hefen zeigen keine Pyruvatdehydrogenase-Aktivität. In aerober, glucoselimitierter, langsam wachsender kontinuierlicher Kultur haben diese Zellen eine geringere Biomasseausbeute als Wildtyphefen (Pronk *et al.* 1994). Trotz fehlender Pyruvatdehydrogenase-Aktivität zeigen auch diese Zellen bei langsamen Verdünnungsraten einen rein respiratorischen Stoffwechsel. Die Enzyme Pyruvatdecarboxylase, Acetaldehyddehydrogenase und Acetyl-Coenzym A-Synthetase könnten eine "metabolische Umleitung" um die defekte Pyruvatdehydrogenase bieten (zur Übersicht s. Pronk *et al.* 1996 und Einleitung Abb. 1-1). Da Acetyl-Coenzym A-Synthetase in dieser Reaktionsfolge ein Molekül ATP pro Molekül Acetat hydrolysiert, ist dieser Weg energetisch aufwendiger für die Zelle. Pronk *et al.* haben 1994 gezeigt, dass der theoretisch ermittelte höhere Energieaufwand für die Zelle sich gut mit der gemessenen schlechteren Biomasseausbeute der Pyruvatdehydrogenase-negativen Zellen deckt.

Wenn *MCH3* für den mitochondrialen Pyruvatcarrier codiert, sollten *MCH3*-negative Mutanten einen ähnlichen Phänotyp zeigen wie Pyruvatdehydrogenase-negative Zellen, da der Pyruvatcarrier für den Stoffwechselweg über die – im Mitochondrium lokalisierte - Pyruvatdehydrogenase gebraucht wird. Die Zellen ohne mitochondrialen Pyruvatcarrier könnten auch die oben beschriebene „metabolische Umleitung“ benutzen um das Pyruvat veratmen zu können, und würden aufgrund des höheren Energieaufwandes dann unter entsprechenden Kulturbedingungen ebenfalls eine niedrigere Biomasseausbeute haben als WT-Zellen. Um zu untersuchen, ob *mch3*- oder *mch1-5*-Zellen einen ähnlichen Phänotyp wie *pda1*-Zellen hatten, wurden die drei Hefestämme K26 WT, *mch3* und *mch1-5* in aerober, glucoselimitierter, langsam wachsender kontinuierlicher Kultur gehalten und die jeweilige Biomasseausbeute in g Trockengewicht pro g Glucose bestimmt. Dazu wurde nach Erreichen eines stabilen Zustands, nach mindestens 50 h (entspricht 5 Verweilzeiten), mehrmals in mehrstündigem Abstand die Trockenmasse der Zellen bestimmt. Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse. Der Wildtyp zeigte eine Trockenmasseausbeute von 0,51 +/- 0,03 g/g Glucose, was gut mit publizierten Werten von 0,52 g/g Glucose (Pronk *et al.* 1994) bzw. 0,50 g/g Glucose (Postma *et al.* 1989) für glucoselimitiertes Wachstum unter den gleichen Wachstumsbedingungen übereinstimmt. Der *mch3*-Stamm zeigte eine signifikant geringere Trockenmasseausbeute von 0,47 +/- 0,02 g, die jedoch etwas über der für den Pyruvatdehydrogenase-negativen Stamm publizierten von 0,44 +/- 0,01 g/g Glucose liegt. Der Hefestamm, bei dem alle fünf Mitglieder der *MCH*-Familie deletiert wurden, zeigte eine deutlich geringere Trockenmasseausbeute von 0,37 +/- 0,02 g/g Glucose. Durch die Deletion vier weiterer Gene können

mehrere Stoffwechselwege gestört sein, was eine geringere Energieeffizienz und damit die geringere Trockenmasseausbeute zur Folge haben könnte.

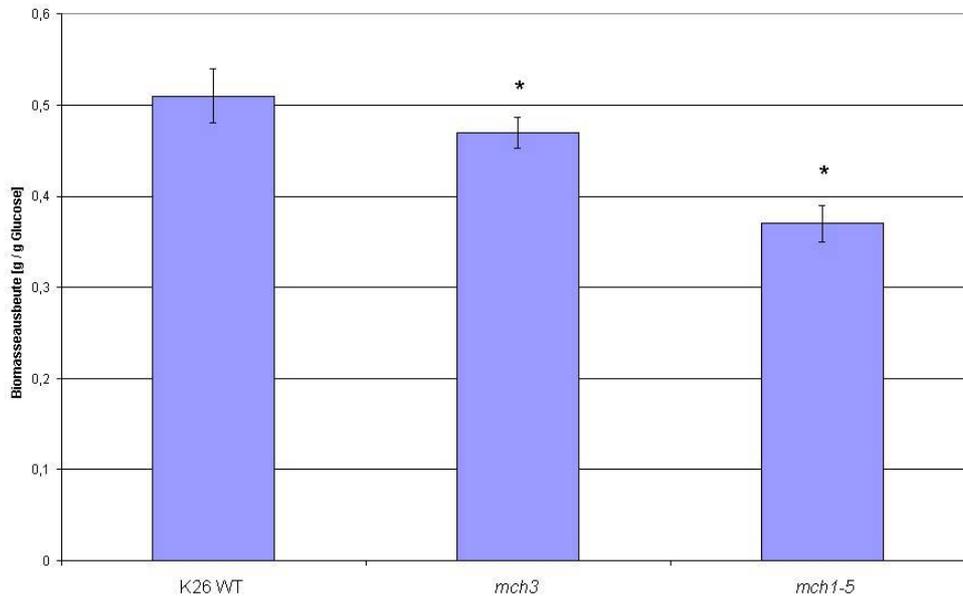


Abbildung 5: Biotrockenmasseausbeute von *S. cerevisiae* K26 WT, *mch3* und *mch1-5* in glucose-limitierter aerober kontinuierlicher Kultur.  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ ,  $c(\text{Glucose}) = 5 \text{ g/l}$ ,  $T = 30^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ . \*:  $p < 0,005$ , Zweistichproben-*t*-Test im Vergleich zu K26 WT.

Dass die *mch3*- und *mch1-5*-Zellen in aerober glucoselimitierter kontinuierlicher Kultur einen ähnlichen Phänotyp wie die *pda1*-Zellen hatten, unterstützt die Hypothese, dass Mch3p der mitochondriale Pyruvatcarrier ist. Bestätigen ließe sich das durch Messung der Pyruvataufnahme an isolierten Mitochondrien. Falls Mch3p der mitochondriale Pyruvatcarrier wäre, müssten Mitochondrien aus *mch3*- oder *mch1-5*-Zellen im Vergleich zu Mitochondrien aus WT-Zellen eine niedrigere Aufnahme von Pyruvat zeigen.

### 3.2.6 Mitochondriale Atmung mit verschiedenen Hemmstoffen

Die Pyruvataufnahme von isolierten Mitochondrien ist biochemisch als Protonensymport charakterisiert worden (Halestrap 1975). Um das die Transportreaktionen treibenden Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran aufbauen zu können, müssen die Mitochondrien eine aktive Atmungskette haben. Andererseits muss für die Messung der Stoffwechsel der Mitochondrien gehemmt werden, um eine Umwandlung des aufgenommenen Pyruvats mit evtl. darauf folgendem Verlust der Markierung (z.B. durch Decarboxylierung) zu verhindern. Im folgenden wurde die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien gemessen und die Eignung von in der Literatur beschriebenen Hemmstoffen für ihren Einsatz in Transportexperimenten überprüft.

Es gibt nur wenige Veröffentlichungen zur Messung von Transportprozessen in aus Hefe isolierten Mitochondrien. Für die Entwicklung eines Messsystems wurde deshalb vor allem auf Publikationen zurückgegriffen, die Experimente mit aus Säugern isolierten Mitochondrien beschrieben. Um den mitochondrialen Stoffwechsel zu hemmen, wird meist die Atmungskette vollständig gehemmt (z.B. Halestrap 1975, Titheradge & Coore 1975, Pande & Parvin 1978, Vaartjes *et al.* 1979, Paradies *et al.* 1999). Das am Komplex I angreifende Rotenon muss bei Hefe nicht verwendet werden, da Hefe keinen Komplex I besitzt. Statt dessen wird das am Komplex III angreifende Antimycin A benutzt (z.B. Soetens *et al.* 1998). Durch Zugabe des Elektronendonors Tetramethylparaphenylendiamin (TMPD) kann am Komplex IV wieder ein Membranpotential aufgebaut werden. Die Mitochondrien werden mit radioaktiv markiertem Substrat inkubiert, wenn ein spezifischer Hemmstoff vorhanden ist, wird die Reaktion durch Zugabe dieses Hemmstoffs gestoppt (Inhibitor-Stop-Methode, Dawson *et al.* 1987), sonst muss die Reaktion durch schnelles Trennen der Mitochondrien vom Medium gestoppt werden. Nach Trennung der Mitochondrien vom umgebenden Medium wird die Radioaktivität in den Mitochondrien gemessen.

### 3.2.6.1 Antimycin A

Antimycin A hemmt den Elektronenfluss in der Cytochrom-Reduktase. Eine Zugabe von Antimycin A in einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  hemmte die mitochondriale Atmung vollständig (s. Abbildung 6).

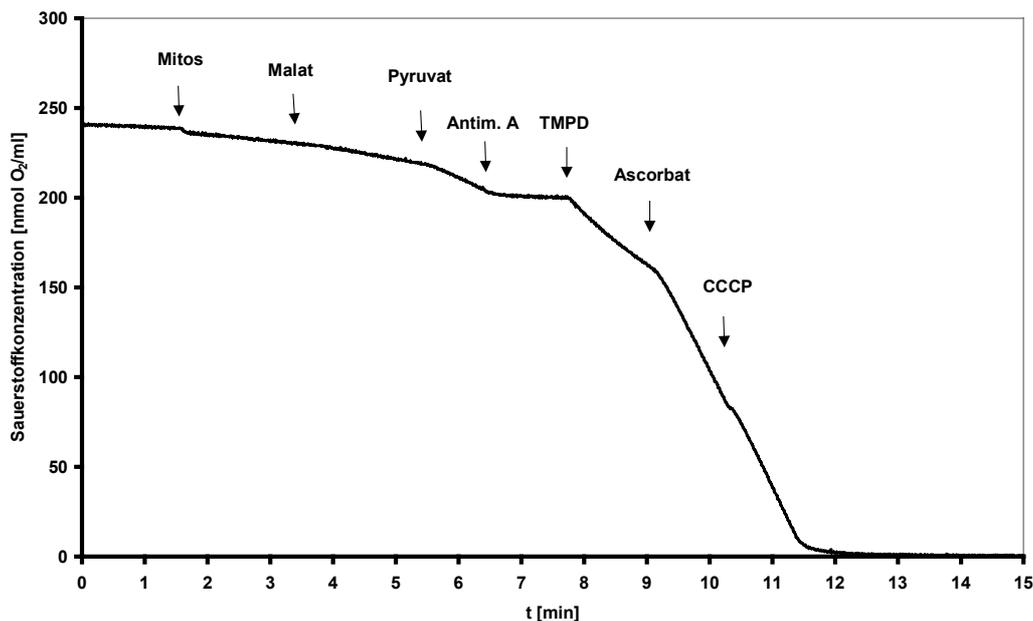


Abbildung 6: Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K26 WT,  $T = 30^\circ\text{C}$ . Zu 2 ml Mitochondrienpuffer wurden 40  $\mu\text{l}$  Mitochondrien in SEM (480  $\mu\text{g}$  Protein) gegeben, 0,5 mM Malat, 0,5 mM Pyruvat, Antimycin A 1  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{M}$  TMPD, 3 mM Ascorbat und 25  $\mu\text{M}$  CCCP. Die folgende Tabelle zeigt die spezifische Atmungsaktivität der Mitochondrien.

Tabelle 7: Spezifische Atmungsaktivität der Mitochondrien im in Abbildung 6 gezeigten Experiment.

	Atmungsrate [nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> (mg Protein) <sup>-1</sup> ]
Mitochondrien (240 µg/ml)	10
+ 0,5 mM Malat	21
+ 0,5 mM Pyruvat	62
+ Antimycin A	0
+ TMPD	115
+ Ascorbat	282
+ CCCP	297

### 3.2.6.2 TMPD/Ascorbat

TMPD kann Elektronen direkt auf Cytochrom c übertragen, die dann an den Komplex IV weitergegeben werden und so den Aufbau eines Membranpotentials treiben. TMPD wird von Ascorbat wieder reduziert. Nach Hemmung der mitochondrialen Atmung mit Antimycin A konnte durch Zugabe von TMPD/Ascorbat wieder eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs erreicht werden (s. Abbildung 6). Bei unveränderter Ascorbatkonzentration war der Sauerstoffverbrauch abhängig von der TMPD-Konzentration. Diese Abhängigkeit zeigte einen typischen Verlauf nach Michaelis-Menten (s. Auftragung nach Eadie-Hofstee in Abbildung 7), so dass  $K_M$ - und  $V_{max}$ -Wert bestimmt werden konnten. Bei einer Temperatur von 30 °C, einer Proteinkonzentration von 150 µg/ml, einer Antimycin A-Konzentration von 1 µg/ml und einer Ascorbatkonzentration von 3 mmol/l waren die kinetischen Parameter:  $K_M = 0,07$  mmol/l,  $V_{max} = 0,8$  mmol O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

Für die Pyruvattransport-Experimente mit Antimycin A und TMPD/Ascorbat wurde eine TMPD-Konzentration von 1,5 µmol/l verwendet. Für diese Konzentration wurde anhand der Daten aus Abbildung 7 ein Sauerstoffverbrauch von etwa 15 nmol O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> abgeschätzt. Im Verlauf eines Transportexperiments sollten die Mitochondrien also bei einer Proteinmenge von 0,5 mg höchstens 8 nmol O<sub>2</sub> / min verbrauchen, was bedeutet, dass bei einer Anfangskonzentration von etwa 250 nmol O<sub>2</sub> / ml der Mitochondrienpuffer nach Ablauf einer Messung von 6 min noch zu etwa 75% sauerstoffgesättigt wäre, somit keine Sauerstofflimitierung biochemischer Prozesse zu erwarten war.

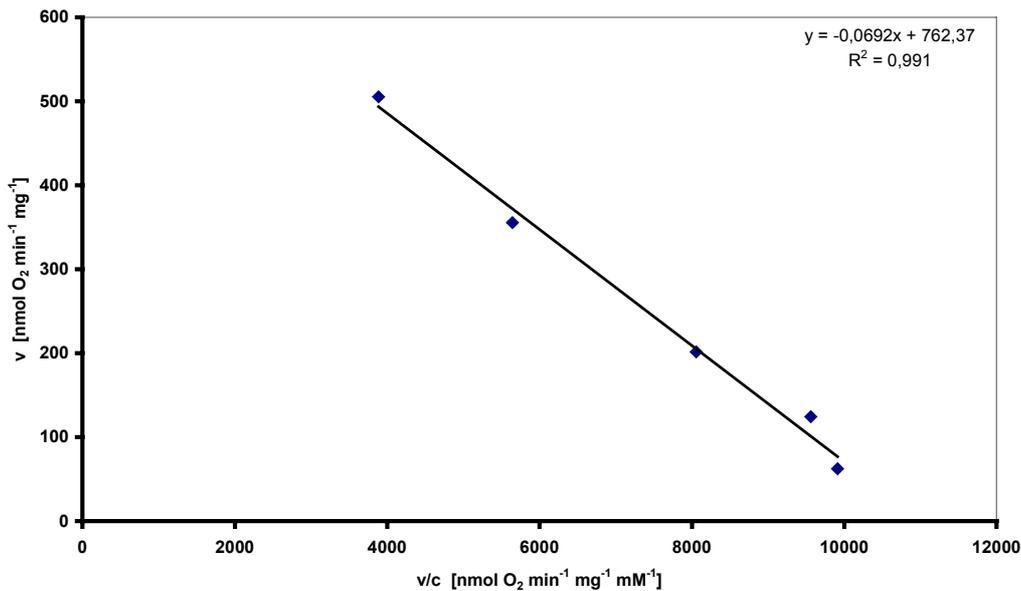


Abbildung 7: Atmung von mit Antimycin A gehemmten Mitochondrien aus *S. cerevisiae*, energetisiert mit TMPD/Ascorbat, T= 30°C. Zu 2 ml Mitochondrienpuffer wurden 40 µl Mitochondrien in SEM (310 µg Protein), Antimycin A 1 µg/ml, 3 mM Ascorbat und verschiedene Konzentrationen TMPD gegeben. Die folgende Tabelle zeigt die spezifische Atmungsaktivität der Mitochondrien.

Tabelle 8: Spezifische Atmungsaktivität der Mitochondrien im in Abbildung 7 gezeigten Experiment.

	Atmungsrate [nmol O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> (mg Protein <sup>-1</sup> )]
Mitochondrien (155 µg/ml)	7
+ Antimycin A 1 µg/ml	7
+ Ascorbat 3 mM	9
+ 0,006 mM TMPD	62
+ 0,013 mM TMPD	124
+ 0,025 mM TMPD	201
+ 0,063 mM TMPD	355
+ 0,13 mM TMPD	505

### 3.2.6.3 Zugabe von α-Cyano-4-hydroxymizsäure

α-Cyano-4-hydroxymizsäure (C4HC) wurde schon in den 70er Jahren als Inhibitor des mitochondrialen Pyruvattransports beschrieben (Halestrap 1975). 10 mM α-Cyano-4-hydroxymizsäure hemmte die pyruvatabhängige Atmung von aus *S. cerevisiae* K26 isolierten Mitochondrien sofort und vollständig (s. Abbildung 8). Citratabhängige Atmung konnte in Anwesenheit des Inhibitors immer noch stattfinden. Die Konzentration von 10 mM wurde in den Pyruvattransport-Experimenten verwendet, um die Transportreaktion abzustoppen.

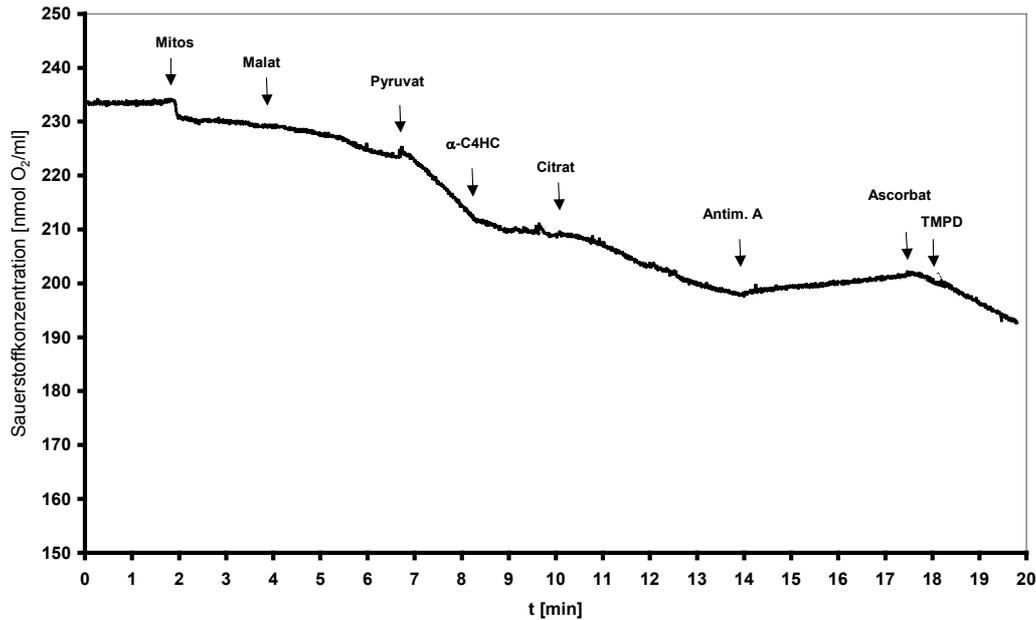


Abbildung 8: Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K26 WT,  $T=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zu 2 ml Mitochondrienpuffer wurden 50  $\mu\text{l}$  Mitochondrien in SEM (280  $\mu\text{g}$  Protein) gegeben, 0,5 mM Malat, 0,5 mM Pyruvat, 10 mM  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, 0,5 mM Citrat, Antimycin A 1  $\mu\text{g/ml}$ , 3 mM Ascorbat und 5  $\mu\text{M}$  TMPD. Die folgende Tabelle zeigt die spezifische Atmungsaktivität der Mitochondrien

Tabelle 9: Spezifische Atmungsaktivität der Mitochondrien im in Abbildung 8 gezeigten Experiment.

	Atmungsrate [ $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ]
Mitochondrien (280 $\mu\text{g/ml}$ )	7
+ 0,5 mM Malat	18
+ 0,5 mM Pyruvat	59
+ 10 mM $\alpha$ -C4HC	9
+ 0,5 mM Citrat	26
+ Antimycin A	-5
+ 3 mM Ascorbat/ 5 $\mu\text{M}$ TMPD	34

### 3.2.7 Pyruvattransport von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* WT und *mch1-5*

Als nächstes wurde versucht, die Aufnahme von radioaktiv markiertem Pyruvat in Mitochondrien aus WT- und *mch1-5*-Zellen zu messen. Die Zellen wurden in Vollmedium mit Glycerin als C-Quelle kultiviert, um eine möglichst hohe Expression des mitochondrialen Pyruvatcarriers zu erreichen. Die mitochondriale Atmung wurde durch Antimycin A gehemmt, durch Zugabe von TMPD und Ascorbat wurde ein Membranpotential aufgebaut. In Abbildung 9 und Abbildung 10 ist jeweils eine typische Messung für Wildtyp und *mch1-5*-Zellen gezeigt.

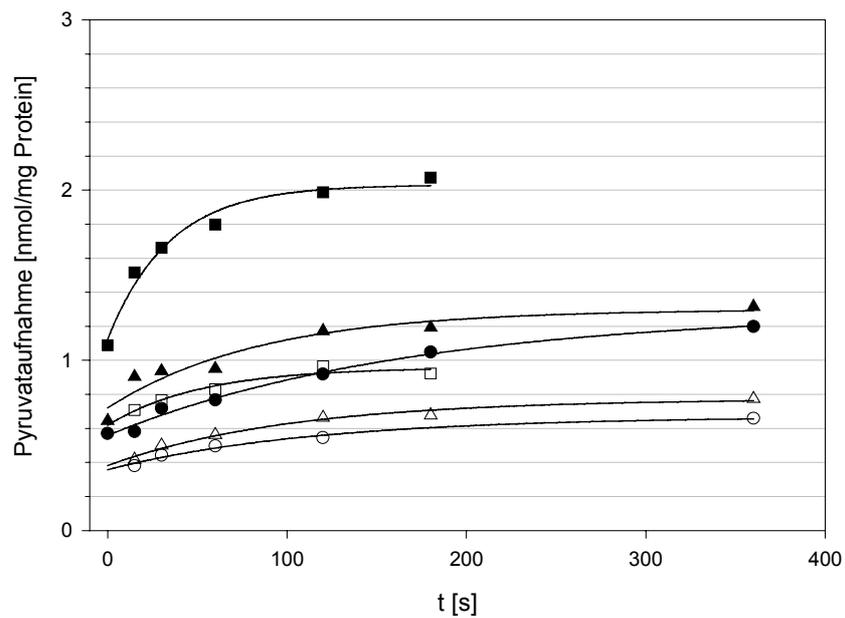


Abbildung 9: Pyruvataufnahme von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K26 WT,  $c(\text{Pyruvat}) = 0,1 \text{ mM}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die offenen Symbole zeigen Messwerte von Mitochondrien, die zwei Minuten mit C4HC vorinkubiert wurden, die dunklen Symbole zeigen Messwerte von in Puffer vorinkubierten Mitochondrien. Gezeigt ist eine typische Messung.

Tabelle 10: Anfangsaufnahmeraten des in Abbildung 9 gezeigten Experimentes.

	nmol Pyruvat $\text{min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
■ Messung 1	1,6
● Messung 2	0,4
▲ Messung 3	0,26
□ Messung H1	0,4
○ Messung H2	0,23
△ Messung H3	0,16

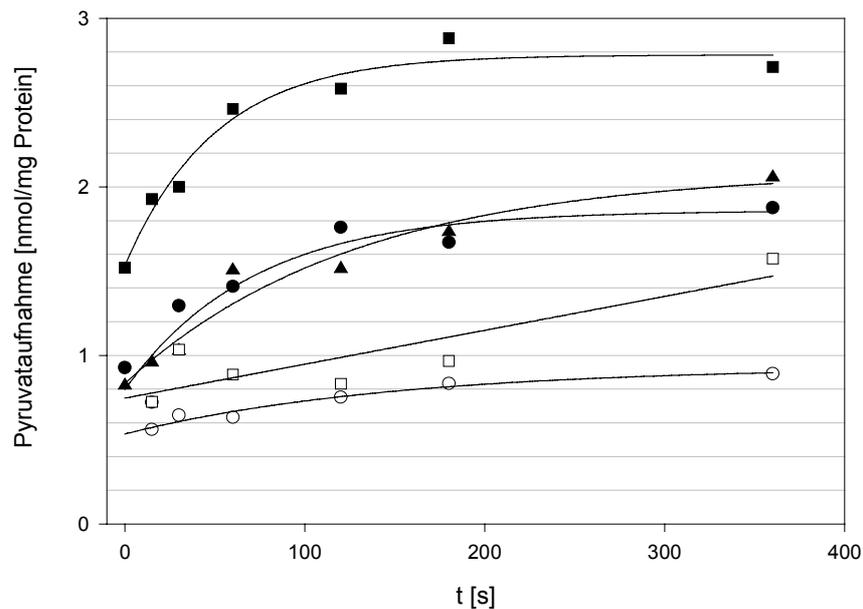


Abbildung 10: Pyruvataufnahme von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K26 mch1-5,  $c(\text{Pyruvat}) = 0,1 \text{ mM}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die offenen Symbole zeigen Messwerte von Mitochondrien, die zwei Minuten mit C4HC vorinkubiert wurden, die dunklen Symbole zeigen Messwerte von in Puffer vorinkubierten Mitochondrien. Gezeigt ist eine typische Messung.

Tabelle 11: Anfangsaufnahmeraten des in Abbildung 10 gezeigten Experimentes.

	$\text{nmol Pyruvat min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
■ Messung 1	1,5
● Messung 2	0,9
▲ Messung 3	0,6
□ Messung H1	0,13
○ Messung H2	0,16

Problematisch war die große Abweichung zwischen aufeinanderfolgenden Messungen einer Präparation. Die zuletzt gemessene ungehemmte Kinetik in Abbildung 9 hatte z.B. eine Anfangssteigung von 16% der Anfangssteigung der zuerst gemessenen Kinetik. Da bei dem Experiment jede ungehemmte Kinetik von einer gehemmten Kinetik gefolgt wurde, waren die zeitlichen Abstände zwischen zwei Messungen erheblich. Der Zeitbedarf für eine ungehemmte Kinetik war etwa 15 min, eine gehemmte Kinetik nahm dagegen etwa 50 min Zeit in Anspruch, da ohne einen Inhibitor für die nicht Cinnamat-hemmbar Reaktion jeder Zeitwert durch direkte Sili-konölzentrifugation und damit einzeln bestimmt werden musste. Zwischen Messung 1 und 3 aus Abbildung 9 liegt daher ein Zeitraum von mehr als zwei Stunden. In dieser Zeit scheint die Fähigkeit der Mitochondrien in SEM-Puffer, Pyruvat aufzunehmen, deutlich abzunehmen.

Auch mit  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamat im Inkubationsmedium war Pyruvataufnahme zu messen. Pande und Parvin (1978) zeigen, dass es sich bei der nicht Cinnamat-hemmbar Pyruvataufnahme wahrscheinlich um Adsorption des Pyruvats an die Mitochondrien handelt.

## Die Mch-Proteinfamilie und mitochondrialer Monocarboxylattransport

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus vergleichbaren Messungen zeigt Tabelle 12. Hier äußert sich das Problem der stark schwankenden Aufnahmeaktivitäten in hohen Standardabweichungen. Die noch in gleichem Maße vorhandene Cinnamat-hemmbar Pyruvataufnahmeaktivität der Mitochondrien aus *mch1-5*-Zellen lässt den Schluss zu, dass Mitglieder der Mch-Proteinfamilie nicht wichtig sind für die Pyruvataufnahme der Mitochondrien.

Tabelle 12: Pyruvataufnahme von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*. Anfangsrate  $\pm$  SD.  $c(\text{Pyruvat}) = 0,1 \text{ mM}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .  $n$ : Zahl der Einzelmessungen.

Mitochondrien aus...	nmol Pyruvat $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	nmol Pyruvat $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , gehemmt mit 10 mM C4HC
K26 WT	$0,46 \pm 0,41$ (n=11)	$0,2 \pm 0,1$ (n=5)
<i>mch1-5</i>	$0,7 \pm 0,4$ (n=6)	$0,17 \pm 0,08$ (n=5)

### 3.2.8 Lactatbestimmung aus *S. cerevisiae* K26 WT und *mch1-5*

Eine Rolle der Mitglieder der Mch-Proteinfamilie im Monocarboxylatstoffwechsel könnte sich auf die Aufnahme oder den Abbau des Monocarboxylats Lactat auswirken. Deswegen wurde der Lactatgehalt von Gesamt- und cytoplasmatischen Extrakten aus WT- und *mch1-5*-Zellen untersucht. Die Plasmamembran von in YPD-Medium gewachsenen Hefezellen wurde mit 20 mg/l Nystatin selektiv permeabilisiert und der Lactatgehalt des Cytoplasmaextraktes und eines Gesamtextraktes der Zellen enzymatisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Sowohl der cytoplasmatische als auch der Gesamtgehalt an Lactat waren in Wildtypzellen und *mch1-5*-Zellen gleich. Auch der Überstand von Kontrollzellen, die 15 min in PIPES-Puffer inkubiert worden waren, enthielt eine signifikante Lactatmenge, die Zellen sezernierten also Lactat.

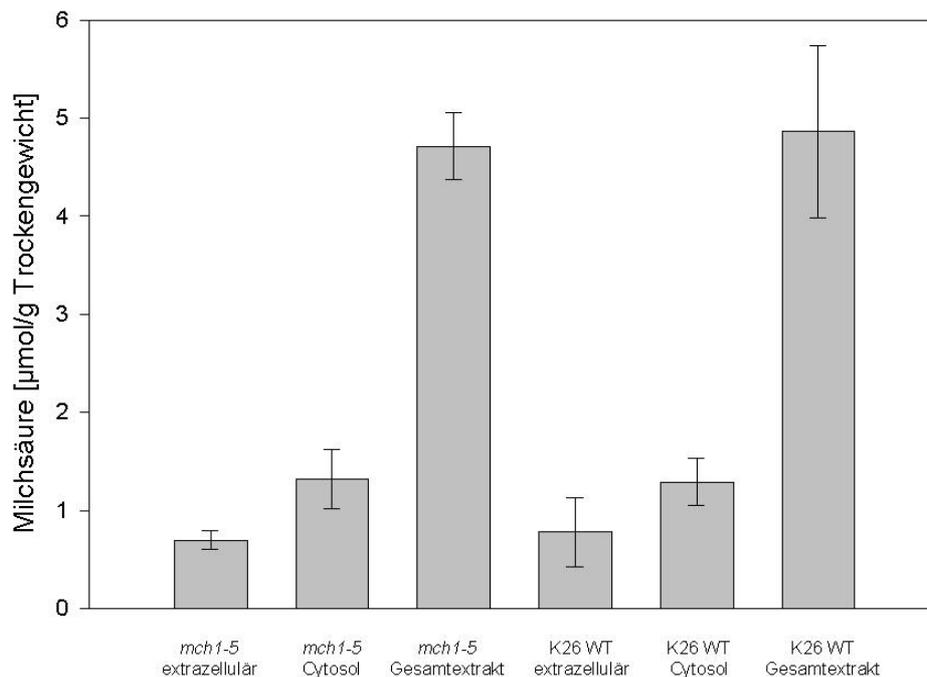


Abbildung 11: Lactatgehalt von in YPD-Medium gewachsenen *S. cerevisiae* K26 WT und *mch1-5* in der exponentiellen Wachstumsphase. Fehlerbalken: SD von drei separaten Ansätzen aus der gleichen Kultur.

Aus den bestimmten Lactatkonzentrationen ließen sich die in Tabelle 13 dargestellten Lactatkonzentrationen in der Zelle abschätzen.

Tabelle 13: Abschätzung der Lactatkonzentration in Cytosol und Vakuole von *S. cerevisiae* K26 WT und *mch1-5* bei folgenden Annahmen: intrazelluläres Gesamtvolumen = 2 ml/ g TM (Gancedo & Serrano 1989). Volumenanteil des Cytoplasmas:  $\frac{3}{4}$ , Volumenanteil der Vakuole:  $\frac{1}{4}$  (Kitamoto et al. 1988). Die restlichen zellulären Kompartimente wurden vernachlässigt.

	Milchsäure „Cytosol“ [µmol/g dw]	Milchsäure „Gesamtextrakt“ [µmol/g dw]	Lactatkonzentration im Cytosol	Lactatkonzentration in Vakuole
K26 WT	1,3 ± 0,2	4,9 ± 0,9	0,9 mmol/l	7 mmol/l
K26 <i>mch1-5</i>	1,3 ± 0,3	4,7 ± 0,4	0,9 mmol/l	7 mmol/l

Es konnte kein Unterschied im Lactatgehalt von Wildtypzellen und *mch1-5*-Zellen gezeigt werden. Eine cytosolische Lactatkonzentration im millimolaren Bereich ist vorstellbar, jedoch ist diese Konzentration in der Vakuole erstaunlich. Literaturwerte zum Lactatgehalt der Vakuole von Bäckerhefe sind nicht bekannt.

### 3.3 Diskussion

Die Lokalisation des 3xHA-Fusionsproteins von Mch3p, einem Mitglied der Mch-Proteinfamilie, in Mitochondrien von *S. cerevisiae* machte dieses Protein mit unbekannter Funktion zu einem Kandidaten für den mitochondrialen Pyruvatcarrier, der bisher funktionell charakterisiert (Halestrap 1975), jedoch noch nicht identifiziert wurde (Nalecz et al. 1991). Die Mch-Proteinfamilie ist homolog zur MCT-Protein-

familie aus Säugern (Nelissen *et al.* 1997), deren Mitglieder Monocarboxylate über die Plasmamembran transportieren (zur Übersicht Halestrap & Price 1999), und Pyruvat ist das wichtigste Monocarboxylat in Mitochondrien (zur Übersicht Pronk *et al.* 1996). Durch Vergleich der Phänotypen von Zellen, denen entweder Mch3p oder alle 5 Mch-Proteine fehlten (*mch3*- bzw. *mch1-5*-Zellen), mit dem WT-Phänotyp sollte untersucht werden, ob die Mch-Proteine eine Rolle im Monocarboxylatstoffwechsel von Bäckerhefe spielten.

In glucoselimitierter aerober kontinuierlicher Kultur ähnelte der Phänotyp von *mch3*- und *mch1-5*-Zellen dem von *pda1*-Zellen, deren Trockenmasseausbeute durch Einschlagen einer energetisch aufwendigen "metabolischen Umleitung" niedriger ist als die von WT-Zellen. Durch das Fehlen der mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-Aktivität kann Pyruvat in den Mitochondrien nicht mehr verarbeitet werden, stattdessen wird es wie bei der alkoholischen Gärung zu Acetaldehyd decarboxyliert, dann jedoch von Acetaldehyddehydrogenase und Acetyl-CoA-Synthase zu Acetyl-CoA umgewandelt, das dann in den Mitochondrien im Citratzyklus vollständig oxidiert werden kann. Das von der Acetyl-CoA-Synthase verbrauchte ATP führt zur schlechteren Trockenmasseausbeute dieser "Umleitung" (Pronk *et al.* 1994). Eine Behinderung der mitochondrialen Pyruvatveratmung durch fehlenden Transport des Pyruvats in die Mitochondrien könnte theoretisch die Zelle zum Einschlagen des gleichen Umwegs zwingen. Die Trockenmasseausbeute der *mch3*- und *mch1-5*-Zellen war jedoch nicht auf den Wert reduziert, der bei Verwendung der "metabolischen Umleitung" über Acetyl-CoA-Synthase erwartet wird und bei *pda1*-Zellen auch gemessen wurde. *mch3*-Zellen hatten eine höhere Trockenmasseausbeute, *mch1-5*-Zellen eine niedrigere Trockenmasseausbeute als *pda1*-Zellen. Die höhere Trockenmasseausbeute der *mch3*-Zellen ließe sich mit der Existenz weiterer Pyruvatcarrier in der inneren Mitochondrienmembran erklären, die die postulierte Rolle von Mch3p teilweise übernehmen könnten. Nicht alles Pyruvat müsste über die ATP kostende metabolische Umleitung verarbeitet werden, der im Vergleich zu *pda1*-Zellen geringere ATP-Verbrauch würde sich in der höheren Trockenmasseausbeute äußern. Die noch niedrigere Trockenmasseausbeute von *mch1-5*-Zellen ist vielleicht auf die Addition verschiedener Effekte des Fehlens von 5 Proteinen zurückzuführen, die in völlig unterschiedlichen Stoffwechselwegen und Kompartimenten aktiv sein können.

Trotz großer Schwankungen zwischen verschiedenen Messungen konnte Cinnamathemmbare Aufnahme von Pyruvat in die Mitochondrien gemessen werden. Dass die Hemmung der Aufnahme von Pyruvat durch 10 mM  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamat spezifisch war, wird durch noch vorhandene Veratmung von Citrat nach Zugabe des Cinnamats nahe gelegt. Isolierte Mitochondrien aus WT- und *mch1-5*-Hefezellen nahmen Pyruvat mit der gleichen Aktivität von etwa 0,4 bis 0,8 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> auf. Aufgrund der großen Schwankungen zwischen aufeinander folgenden Messungen mit der gleichen Mitochondrienpräparation würde eine Reduktion der Aufnahmeaktivität bis zu einem Faktor von mindestens 2 allerdings nicht sichtbar werden.

In Tabelle 14 sind die veröffentlichten kinetischen Daten zum Pyruvattransport in Mitochondrien zusammengefasst. Die einzigen vorliegenden Daten zu Mitochondrien aus *S. cerevisiae* (Briquet 1977) sind von ihrem Autor im veröffentlichten Lineweaver-Burk-Plot eindeutig fehlerhaft bestimmt worden, Transportraten sind nicht angegeben. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Transportgeschwindigkeit bei 25 °C ist vergleichbar mit der bei Rizinuskeimlingen gemessenen,

Mitochondrien aus Rattenleber, die bei 6 °C Pyruvattransport in der gleichen Größenordnung zeigten, werden bei 25 °C vermutlich einen weitaus schnelleren Transport zeigen.

Tabelle 14: Literaturwerte zum Pyruvattransport in isolierte Mitochondrien.

Quelle	Temperatur [°C]	Energetisierung	K <sub>m</sub> [mmol/l]	V <sub>max</sub> [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	Literatur
Rattenleber	6	pH-Gradient	0,15	0,54	Halestrap 1975
Bäckerhefe	10	evtl. pH-Gradient	6,2	/	Briquet 1977
Rizinuskeimling	30	Malat	0,1	0,95	Brailsford <i>et al.</i> 1986

Bei Wachstum im Schüttelkolben in Vollmedium mit den Kohlenstoffquellen (C-Quellen) Glucose, Glycerin, Ethanol und Lactat zeigten WT- und *mch1-5*-Zellen keine Unterschiede. Sowohl die erreichte Biomasse als auch der Verbrauch der Kohlenstoffquellen Glucose und Ethanol sowie die Produktion von Ethanol bei Wachstum auf Glucose waren gleich. Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen, die bei aerober glucoselimitierter kontinuierlicher Kultur erhalten worden waren. Auch die *pda1*-Mutante, die in glucoselimitierter kontinuierlicher Kultur eine geringere Biomasseausbeute hat als der WT, zeigt in Vollmedium keinen Wachstumsdefekt (Pronk *et al.* 1994).

WT und *mch1-5*-Zellen hatten keinen unterschiedlichen Lactatgehalt nach Wachstum in Vollmedium mit Glucose als C-Quelle. Hefemitochondrien können zwei Lactatdehydrogenasen exprimieren, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (zur Übersicht de Vries & Marres 1987). Zusätzlich gibt es aber auch Lactatdehydrogenasen in der mitochondrialen Matrix. Die Expression dieser verschiedenen Lactatdehydrogenasen wird stark differentiell reguliert durch das Angebot an Nährstoffen im Medium. Die Rolle der Lactatdehydrogenasen in Säugerzellen wird in letzter Zeit wieder neu diskutiert. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass während dieser Arbeit ein Mitglied der MCT-Familie (also ein Homolog der Mch-Proteinfamilie) in Muskelzellmitochondrien mit Western Blot und Immunoelektronenmikroskopie nachgewiesen wurde (Brooks *et al.* 1999). Eine fehlende Lactattransportfunktion in der inneren Mitochondrienmembran könnte den Gesamtgehalt der Zellen an Lactat beeinflussen. Dass kein Unterschied zwischen WT- und *mch1-5*-Zellen gemessen wurde, heißt aber nicht, dass eine Funktion von Mch-Proteinen als Lactattransporter ausgeschlossen wäre.

Eine Verbindung der Mch-Familie zum mitochondrialen Pyruvattransport konnte nicht gezeigt werden. Die Suche nach dem mitochondrialen Pyruvattransporter wurde daraufhin in der mitochondrialen Carrierfamilie MCF fortgesetzt (siehe Kapitel 5).

## 4 Andere Funktionen der Mch-Proteinfamilie

### 4.1 Einleitung

Die Identifizierung des Monocarboxylattransporter-Homologs TAT1 als Transportprotein für aromatische Aminosäuren in der Ratte (Kim *et al.* 2001) brachte Eckhard Boles und Judita Makuc dazu, die Regulation der Synthese der Mitglieder der Mch-Proteinfamilie durch Aminosäuren zu untersuchen. Zur besseren Übersicht sind ihre Ergebnisse in Tabelle 15 zusammengefasst.

*Tabelle 15: Ergebnisse von Judita Makuc zur Regulation der Mch-Proteinbiosynthese durch Aminosäuren. Die Versuche wurden auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit 2% Glucose als C-Quelle und 38 mM Ammonium oder 10 mM Prolin als Stickstoffquelle durchgeführt, dem je eine Aminosäure in der Endkonzentration 10 mM zugefügt worden war. Die Expression von MCH1-lacZ änderte sich unter keiner der getesteten Bedingungen, die Aminosäuren Arg, Lys, Ser, Asn, Val, Ala und His führten bei keinem der getesteten Stämme zu Induktion oder Repression der MCH-lacZ-Expression. Symbole vor dem Schrägstrich: Ammonium als Stickstoffquelle, Symbole hinter dem Schrägstrich: 10 mM Prolin als Stickstoffquelle. - -: reprimiert, +++ stark induziert, ++++ sehr stark induziert.*

	MCH2-lacZ	MCH3-lacZ	MCH4-lacZ	MCH5-lacZ
Asp		/--		/--
Glu				/(-)
Gln		/--		/(-)
Cys		/--		/++++
Gly			+++ /++++	
Leu			+++ /	/--
Ile			+++ /	/--
Thr			+++ /	
Met			+++ /	/(-)
Tyro		++++ /		
Phe	/++++	+++ /		
Trp	+++ /++++	++++ /++++	/+++	

Interessant war vor allem die starke Induktion der Transkription von *MCH3-lacZ* durch aromatische Aminosäuren, am stärksten durch Tryptophan. Auch mit Ethanol als Kohlenstoffquelle (C-Quelle) wurde die Expression von Mch3p durch aromatische Aminosäuren induziert: die spezifische  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Zellen, die eine *MCH3-lacZ*-Fusion exprimierten, stieg bei Wachstum mit 10 mM Phe, Tyr oder Trp um mehr als das hundertfache (pers. Information J. Makuc). Die Induktion der Synthese von Mch3p durch aromatische Aminosäuren und vor allem Tryptophan deutet auf eine Rolle von Mch3p im Tryptophanstoffwechsel hin.

Der Tryptophankatabolismus von Zellen ohne Mch3p sollte mit dem von WT-Zellen verglichen werden, außerdem sollte untersucht werden, ob Mch3p ein mitochondrialer Tryptophantransporter ist.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Wachstum von Hefezellen mit Tryptophan als N-Quelle

Wegen der vermuteten Rolle von Mch3p im Tryptophanstoffwechsel wurde untersucht, ob *mch3*- oder *mch1-5*-Zellen bei Wachstum mit Tryptophan als einziger Stickstoffquelle einen Wachstumsnachteil hatten. In Succinat-gepuffertem YNB-Minimalmedium mit 2% Glucose als C-Quelle und 1g/l Tryptophan als Stickstoffquelle (N-Quelle) (MTD-Medium) wuchsen alle drei Zellarten aber gleich gut (vgl. Abbildung 12, nur gezeigt für WT und *mch3*). Bei der Kultivierung der Zellen färbte sich das Medium deutlich rot. Das Medium der *mch3*- und *mch1-5*-Zellen wurde nicht so rot wie das Medium der WT-Zellen. Da die Färbung des Mediums von *mch3*- und *mch1-5*-Zellen gleich stark war, wurden die folgenden Messungen nur mit WT- und *mch3*-Zellen durchgeführt.

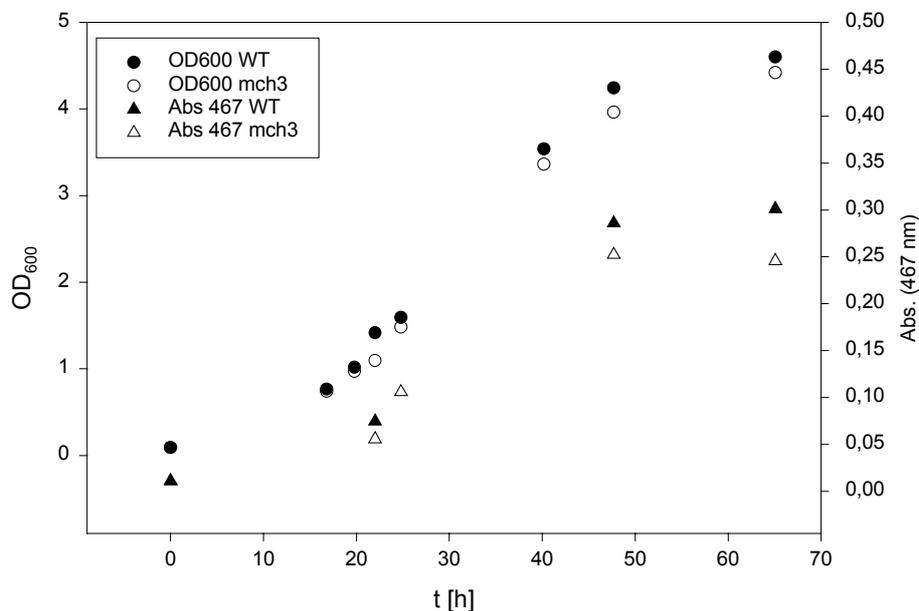


Abbildung 12: Wachstum von *S. cerevisiae* K26 WT und *mch3* in Succinat-gepuffertem Minimalmedium mit 2% Glucose als C-Quelle und 1 g/l Tryptophan als N-Quelle. Die Kreise zeigen die Entwicklung der  $OD_{600}$ , die Dreiecke die Absorption des Mediums bei 467 nm.

In im Photometer (Beckman DU640) aufgenommenen Spektren des rot gefärbten Kulturmediums konnte man bei ca. 467 nm eine Schulter erkennen. Die Absorption bei 467 nm könnte zu einem roten Farbeindruck führen. In Tabelle 16 sind die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 467 nm für Medienproben angegeben, die während der Kultur von K26 WT- und *mch3*-Zellen genommen wurden. Die Absorption des Mediums bei 467 nm nahm während des Wachstums der Zellen zu.

Tabelle 16: Absorption von MTD-Medium, in dem K26-Bäckerhefezellen kultiviert wurden, bei 467 nm. n.d.: nicht gemessen.

MTD-Medium	A <sub>467</sub> WT	A <sub>467</sub> <i>mch3</i>
t = 0 h	0,01	0,01
t = 22 h	0,09	0,06
t = 25 h	n.d.	0,11
t = 48 h	0,30	0,25
t = 65 h	0,31	0,25

Das Phänomen der Rotfärbung des Mediums bei Wachstum von Hefezellen in tryptophanhaltigem Medium ist in der Literatur nicht beschrieben. Die einzige wohl-bekannteste Verbindung zwischen Hefezellen und Rotfärbung ist der Phänotyp von *ade2*-Hefezellen. Diese Zellen sind Adenin-auxotroph, weil ein, vom *ADE2*-Gen kodiertes, Enzym des Adeninsynthesewegs defekt ist. Aus diesem Grund akkumuliert das Zwischenprodukt 4-Aminoimidazol-Ribotid (AIR) in den Zellen. Ein Oxidationsprodukt von AIR ist rot gefärbt und führt zu einer Rotfärbung der Zellen. Um die Färbung des Mediums von *ade2*-Zellen zu untersuchen, wurden W303-1A-Zellen (die *ade2* sind) in MAD-Medium (Ammonium als N-Quelle) kultiviert. Nach Abzentrifugieren des Mediums war das Medium farblos, das Zellpellet war rosafarben. K26-Zellen waren dagegen beige gefärbt nach Kultur in MTD-Medium, nur die Farbe des Mediums änderte sich. Es scheint also keine direkte Verbindung zwischen der Rotfärbung von *ade2*-Zellen und der Rotfärbung des MTD-Mediums mit WT-Zellen zu geben.

### 4.2.2 Transport von Tryptophan

Um Unterschiede in der Aufnahme von Tryptophan in Mitochondrien aus WT-Zellen bzw. Zellen ohne Mch-Proteine messen zu können, wurde eine Methode entwickelt zur Messung der Tryptophanaufnahme in isolierte Mitochondrien mit radioaktiv markiertem Substrat. Als Ausgangspunkt diente die einzige publizierte Methode zur direkten Messung der Aufnahme einer Aminosäure in isolierte Hefemitochondrien. Sie wurde von Francis Sluse und Mitarbeitern erfolgreich zur Messung der Aufnahme von Arginin und Ornithin angewendet (Soetens *et al.* 1998). Die Mitochondrien sind bei dieser Methode durch Hemmung der Atmungskette vollständig deenergetisiert, die gemessenen Transportreaktionen finden also alle im Austausch mit Substrat in der mitochondrialen Matrix statt. Da kein spezifischer Hemmstoff zum Beenden der Transportreaktion zur Verfügung stand, wurde die Reaktion durch Trennen der Mitochondrien vom umgebenden Medium mit Silikonölzentrifugation gestoppt.

Die Tryptophanaufnahme ließ sich reproduzierbar messen, die Messwerte folgten einem Verlauf erster Ordnung. Mit 1 mM Tryptophan wurde eine Anfangsaufnahmerate von etwa  $0,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  ermittelt, die maximal akkumulierte Menge betrug  $3-4 \text{ nmol} (\text{mg Protein})^{-1}$ . Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse einer typischen Messung. Auffallend ist der mit ca.  $1,5 \text{ nmol/mg Protein}$  recht hohe Anfangswert der Aufnahmekinetik. Die auf Eis durchgeführte Aufnahmereaktion zeigte Werte bei  $1,5 \text{ nmol/mg Protein}$  über den gesamten Messzeitraum von 30 min. Da hier offensichtlich keine Aufnahme stattfand, sind die  $1,5 \text{ nmol/mg Protein}$  als Hintergrundwert zu betrachten, der möglicherweise durch den Durchtritt der hydrophoben Aminosäure Tryptophan durch das Silikonöl in die untere Phase zu erklären ist.

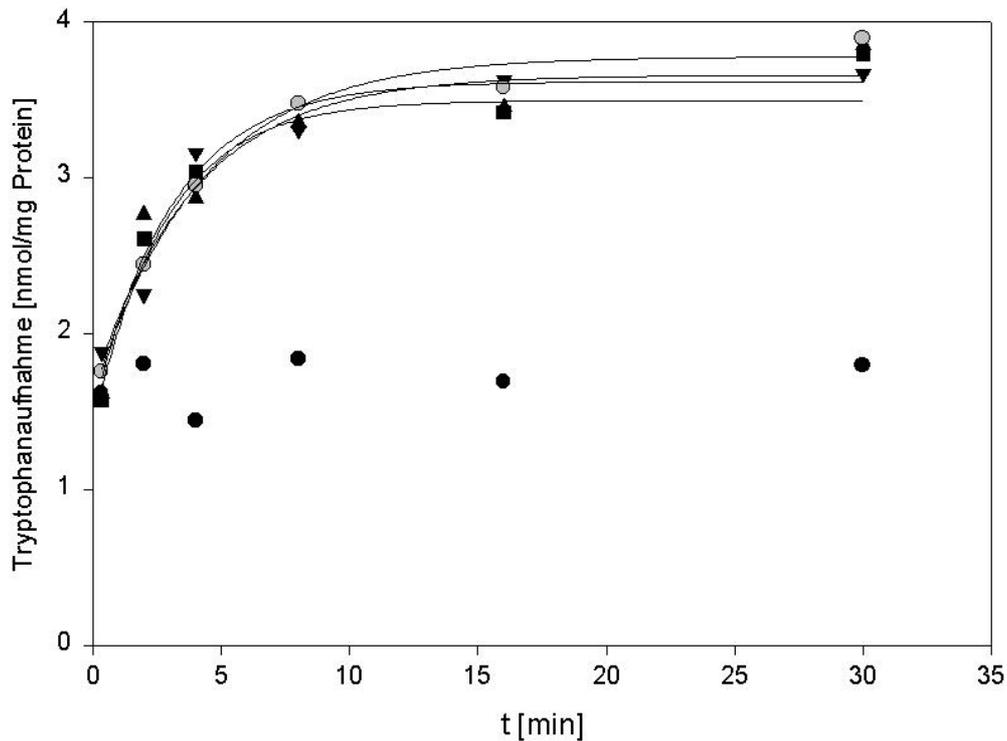


Abbildung 13: Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -markiertem L-Tryptophan in Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K26 WT, gewachsen in MAE-Medium,  $c(\text{Trp}) = 1 \text{ mM}$ . Die Symbole bezeichnen jeweils eine Messreihe. schwarze Symbole:  $c(\text{Protein}) = 2 \text{ mg/ml}$ , schwarze Kreise: die Transportreaktion wurde auf Eis durchgeführt, graue Kreise:  $c(\text{Protein}) = 1 \text{ mg/ml}$ .

Weder nach Wachstum in MAE-Medium, noch nach Wachstum in MAE-Medium, dem je 1 g/l Trp, Tyr und Phe zugesetzt worden waren (entspricht ca. 5 mM), zeigte sich ein Unterschied in der Aufnahmerate oder der insgesamt akkumulierten Substratmenge zwischen WT- und *mch1-5*-Mitochondrien (Tabelle 17). Sowohl die gleiche Aufnahmeaktivität mit und ohne *MCH*-Gene als auch die nicht vorhandene Induktion der Aufnahmeaktivität durch aromatische Aminosäuren sprechen gegen eine Funktion der Mch-Proteine als Transporter für Tryptophan in der inneren Mitochondrienmembran.

## Andere Funktionen der Mch-Proteinfamilie

Tabelle 17: Aufnahme von L-<sup>14</sup>C-Tryptophan in isolierte Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K26 WT und *mch1-5*, gewachsen in MAE-Medium oder MAE-Medium mit je 5 mM Trp, Tyr und Phe ("MAE FYW").  $c(\text{Trp}) = 1 \text{ mM}$ .

	$v_0$ [nmol min <sup>-1</sup> (mg Protein) <sup>-1</sup> ]	max. Akkumulation [nmol (mg Protein) <sup>-1</sup> ]
WT MAE	0,56 ± 0,12	3,66 ± 0,04
<i>mch1-5</i> MAE	0,64 ± 0,09	3,59 ± 0,07
WT MAE FYW	0,7 ± 0,2	4,4 ± 0,3
<i>mch1-5</i> MAE FYW	0,61 ± 0,14	4,16 ± 0,04

### 4.2.3 Aminosäuren in WT-, *mch3*- und *mch1-5*-Zellen

Um weitere Hinweise auf die Funktion der Mch-Proteine zu bekommen, wurde die Zusammensetzung des Aminosäurepools von WT-, *mch3*- und *mch1-5*-Zellen untersucht. Die Zellen wurden in Succinat-gepuffertem YNB-Minimalmedium mit Ammonium bzw. Tryptophan als N-Quelle angezogen und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Aminosäurezusammensetzung von in der Glas-mühle hergestellten Gesamtextrakten wurde mit HPLC untersucht (Abbildung 14 und Abbildung 15).

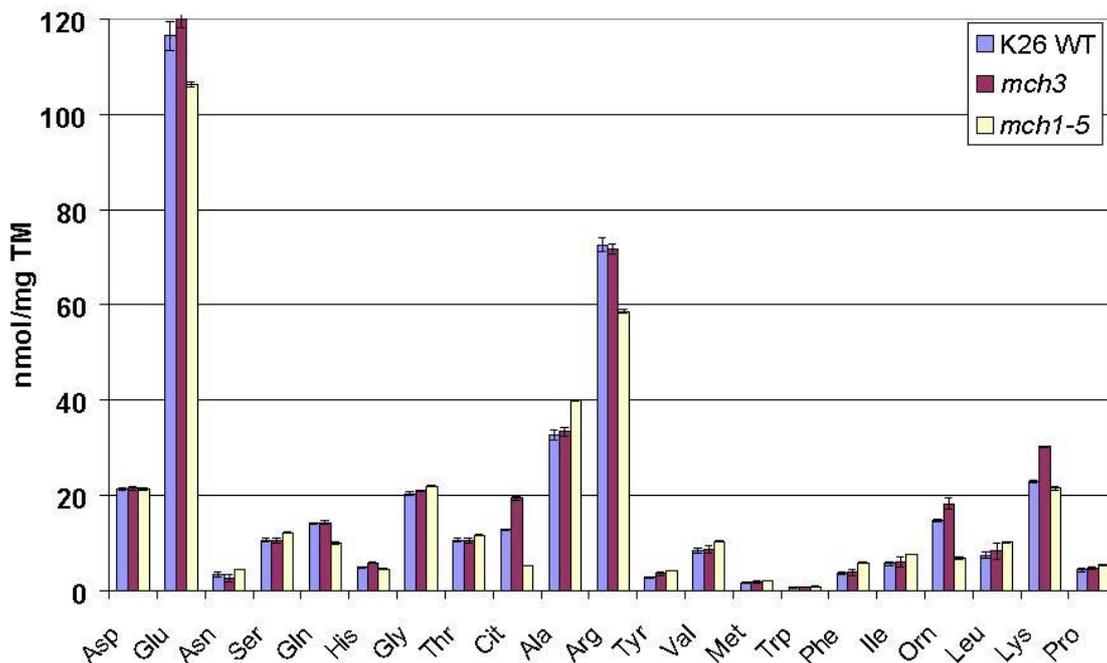


Abbildung 14: Aminosäuregehalt von Gesamtextrakten aus in MAD-Medium kultivierten *S. cerevisiae* K26. Abkürzungen der Aminosäuren im Dreibuchstabencode. Orn: Ornithin, Cit: Citrullin. Fehlerbalken: SD von 3 Extrakten aus der gleichen Kultur.

Bei Wachstum in MAD-Medium waren bei *mch1-5*-Zellen einige Unterschiede zu beobachten: Citrullin, Arginin und Ornithin waren in geringerer Menge vorhanden als bei WT- und *mch1-5*-Zellen, Alanin war etwas mehr vorhanden. Die Aminosäurepools von in MTD-Medium kultivierten Zellen waren insgesamt deutlich kleiner: der

Gesamtaminosäuregehalt der Zellen in MAD-Medium betrug bei den drei untersuchten Stämmen 370-420 nmol/ mg TM, in MTD-Medium enthielten die Zellen nur 230-260 nmol Aminosäuren/ mg TM.

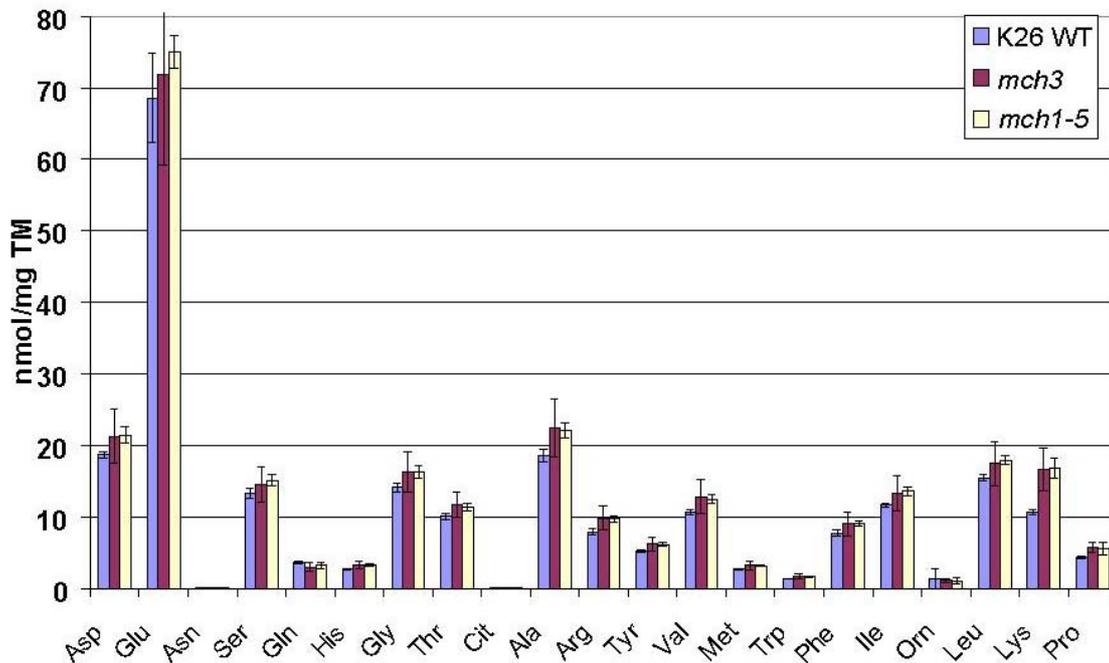


Abbildung 15: Aminosäuregehalt von Gesamtextrakten aus in MTD-Medium kultivierten *S. cerevisiae* K26. Abkürzungen der Aminosäuren im Dreibuchstabencode. Orn: Ornithin, Cit: Citrullin. Fehlerbalken: SD von 3 Extrakten aus der gleichen Kultur.

### 4.3 Diskussion

Wegen der transkriptionellen Induktion von *MCH3* durch aromatische Aminosäuren und der Identifikation eines homologen MCT-Proteins als Transporter für aromatische Aminosäuren wurde eine Funktion von Mch3p als mitochondriales Tryptophan-Transportprotein postuliert. Die Tryptophanaufnahme von isolierten Mitochondrien aus Bäckerhefe konnte reproduzierbar gemessen werden. Die einzigen veröffentlichten Werte zur Aufnahme von Aminosäuren in isolierte Hefemitochondrien sind die von Soetens *et al.* (1998) gemessenen. Arginin wurde bei 30 °C mit einer Anfangsgeschwindigkeit von etwa  $6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  aufgenommen, Ornithin mit einer Anfangsgeschwindigkeit von etwa  $1 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ . Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Tryptophanaufnahmeaktivität von etwa  $0,6 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  liegt in der gleichen Größenordnung.

Kultivierung der Zellen in Medium mit 5 mM Trp, Tyr und Phe erhöhte die Tryptophanaufnahmeaktivität isolierter Mitochondrien aus diesen Zellen nicht. Da die Expression einer *MCH3-lacZ*-Fusion in vergleichbarem Medium stark induziert worden war (Judita Makuc, pers. Information), scheint *MCH3* nicht für die Tryptophanaufnahme der Mitochondrien verantwortlich zu sein. Auch die im Vergleich zum WT nicht verminderte Tryptophanaufnahmeaktivität in *mch1-5*-Zellen zeigt, dass die Hypothese, Mch3p sei ein mitochondrialer Tryptophantransporter, falsch war.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von K26 WT, *mch3*- und *mch1-5*-Zellen brachte keinen neuen Erkenntnisse über die Funktion von Mch3p. Sowohl bei Kultur mit Ammonium als N-Quelle (MAD-Medium) als auch mit Tryptophan als N-Quelle (MTD-Medium) unterschied sich die Aminosäurezusammensetzung der *mch3*-Zellen nicht von der der WT-Zellen. *mch1-5*-Zellen enthielten bei Wachstum in MAD-Medium geringere Mengen der Aminosäuren Arginin, Ornithin und Citrullin, was auf eine Rolle eines der vier anderen Mch-Proteine im Argininstoffwechsel hinweist.

Der insgesamt deutlich niedrigere Aminosäuregehalt der in MTD-Medium kultivierten Zellen korreliert mit dem langsameren Wachstum der Zellen in diesem Medium: Ammonium ist eine bevorzugte Stickstoffquelle von Bäckerhefe (zur Übersicht Hofmann-Bang 1999), solange es im Medium vorhanden ist, wird keine andere Stickstoffquelle aufgenommen. Alle Aminosäuren außer Cystein, Glycin und Lysin können auch als Stickstoffquelle verwendet werden, die Wachstumsgeschwindigkeit ist jedoch bei den meisten Aminosäuren deutlich geringer als bei Ammonium als N-Quelle (Cooper 1982). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Hefezellen betrug die Verdopplungszeit in MAD-Medium etwa 2 h, in MTD-Medium etwa 8 h (nicht gezeigt). Nur eine ausreichend hohe Konzentration von freien Aminosäuren ermöglicht eine schnelle Proteinsynthese und damit schnelles Wachstum. Ob hier das niedrigere intrazelluläre Aminosäureangebot das langsamere Wachstum bedingte, oder ob das aus einem anderen Grund langsamere Wachstum die niedrigeren Aminosäurekonzentrationen bedingte, kann nicht gesagt werden. Andere Gründe für das langsamere Wachstum wären z.B. ein höherer Bedarf an Reduktionsäquivalenten bei Tryptophanverstoffwechslung oder die limitierende Aktivität eines Enzyms des Tryptophankatabolismus.

Die schwächere Rotfärbung des MTD-Mediums bei Kultur von *mch3*- und *mch1-5*-Zellen ist, neben dem Phänotyp in glucoselimitierter kontinuierlicher Kultur (s. Kapitel 3), das einzige bisher gefundene phänotypische Merkmal, das vom WT abweicht. In der Literatur ist das Auftauchen eines roten Farbstoffs bei Kultivierung von Bäckerhefe mit Tryptophan als N-Quelle nicht beschrieben. Mit dem bekannten Phänotyp von *ade2*-Zellen hat das Phänomen nichts zu tun: *ade2*-Zellen waren bei Kultur in MAD-Medium selbst rosa gefärbt, das Medium blieb farblos, umgekehrt änderten die K26-Hefezellen bei Kultur in MTD-Medium ihre Farbe nicht, nur das Medium wurde rot. Das bei *ade2*-Zellen durch Blockade der Adeninsynthese entstehende Derivat von 4-Aminoimidazol-Ribotid (AIR) akkumuliert in der Vakuole und oxidiert dort zu dem roten Farbstoff (Eckhard Boles, pers. Information).

Ein Nebenweg des Tryptophan-Katabolismus ist die NAD-Synthese über Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilat. Während die ersten beiden Schritte dieses Stoffwechselweges zumindest bei Säugetieren im Cytosol stattfinden (BRENDA-Enzymdatenbank, <http://www.brenda.uni-koeln.de>), ist die den dritten Schritt katalysierende Kynurenin-3-hydroxylase (EC 1.14.13.9) bei der Ratte und *S. cerevisiae* mitochondrial lokalisiert (Schott und Staudinger 1971). Die Stoffwechseldatenbank WIT (What is there, <http://wit.mcs.anl.gov>) plaziert auch den nächsten Schritt dieses Weges noch in der mitochondrialen Matrix, bevor 3-Hydroxy-Anthranilat dann aus der mitochondrialen Matrix ins Cytosol transportiert wird und dort zum NAD-Vorläufer Chinolinat umgewandelt wird. Auch ein anderes Enzym des Kynurenin-Stoffwechsels, die Kynurenin-Oxoglutarat-Transaminase (EC 2.6.1.7), ist bei der Ratte an oder in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Takeuchi *et al.* 1983). Die

Lokalisation dieser Enzyme könnte also einen Kynurenin-Transporter in der inneren Mitochondrienmembran nötig machen, und Mch3p wäre ein Kandidat dafür. Auch für den Transport des evtl. intramitochondrial entstehenden 3-Hydroxy-Anthranilats aus den Mitochondrien ins Cytosol könnte Mch3p verantwortlich sein. Zum Wachstum von Hefezellen mit Tryptophan ist bekannt, dass Tryptophan die Niacin-Produktion - über 3-Hydroxy-Anthranilat - verdoppelt (Shin *et al.* 1982), außerdem sezerniert *S. cerevisiae* 3-Hydroxy-Anthranilat bei Tryptophanzugabe (Gaertner & Shetty, 1975). Ein Dimer von 3-Hydroxy-Anthranilat, das durch enzymatische und nichtenzymatische Oxidation entsteht, ist die rote Cinnabarinsäure (Ogawa *et al.* 1983). Dieser Stoff hat ein Absorptionsmaximum von 460 nm, könnte also für die rote Farbe bzw. die Schulter im Spektrum verantwortlich sein. Eine verringerte mitochondriale 3-Hydroxy-Anthranilat-Produktion durch Ausfall eines Kynurenin- oder 3-Hydroxy-Anthranilattransporters könnte zu verringerter Sezernierung des 3-Hydroxy-Anthranilats ins Medium und so zur beobachteten schwächeren Rotfärbung des Mediums führen.

## 5 Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie

### 5.1 Einleitung

Die Suche nach dem mitochondrialen Pyruvattransporter wurde in der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) fortgesetzt. Zu Beginn dieser Untersuchungen war 12 der 35 Mitglieder der MCF eine Transportfunktion in der inneren Mitochondrienmembran zugeordnet worden. Alle Mitglieder der MCF waren schon einzeln in *S. cerevisiae* deletiert worden. Wenn der Pyruvatcarrier ein Mitglied der MCF wäre, müsste die Deletion des entsprechenden Gens zu einem deutlichen Phänotyp führen. Da der Pyruvatcarrier aber noch nicht identifiziert worden war, bestand die Vermutung, dass mehrere MCF-Mitglieder Pyruvat in die Mitochondrien transportieren konnten. Geplant war deshalb, je zwei ORFs auf einmal zu deletieren, um so einen deutlicheren Phänotyp zu erhalten. Wegen der zentralen Bedeutung des Pyruvatcarriers wurden ORFs gewählt mit einem hohen *codon adaptation index (cai)* als Hinweis auf hohe Expression (Sharp & Li 1987) und wichtige Funktion. Die MCF-Mitglieder mit dem höchsten *cai* sind ein Gen für einen ATP-Carrier *AAC2* (*cai* 0,539) und das Gen für den Phosphatcarrier *MIR1* (*cai* 0,358). *YHM1* hat mit 0,209 den vierthöchsten *cai* der MCF. Den niedrigsten *cai* hat das Gen *MRS3* (*cai* 0,083). Folgende vier ORFs wurden ausgewählt:

Tabelle 18: Zur Deletion ausgewählte ORFs.

ORF	Gennamen	cai	zu Beginn der Untersuchungen vorhandene Informationen
YDL198c	<i>YHM1</i>	0,209	wird in der G2-Phase des Zellzyklus induziert (Cho <i>et al.</i> 1998b), <i>abf2</i> -Suppressor (Kao <i>et al.</i> 1996)
YER053c	-	0,158	Deletionsmutante zeigt ähnlichen Phänotyp wie <i>pda1</i> -Zellen (pers. Information E. Boles), Transkription nimmt mit sinkender Glucosekonzentration zu (de Risi <i>et al.</i> 1997), Ähnlichkeit zu mitochondrialem Phosphatcarrier Mir1p
YOR222w	-	0,181	hohe Ähnlichkeit zu YPL134c
YPL134c	-	0,123	hohe Ähnlichkeit zu YOR222w, induziert beim <i>diauxic shift</i>

Das ORF-Paar YPL134c/YOR222 ist untereinander sehr ähnlich, es codiert für zwei Isoformen eines Proteins. Das machte die beiden ORFs zusätzlich zu guten Kandidaten für eine Funktion als Pyruvatcarrier (s.o.).

Die Deletionsmutanten wurden von Judita Makuc im Labor von Eckhard Boles an der Universität Düsseldorf hergestellt. YDL198c und YER053c wurden nacheinander im Stamm CEN.PK113-5D ("K1") deletiert, YPL134c und YOR222w nacheinander im isogenen Stamm CEN.PK113-13D ("K26") mit anderem Paarungstyp. Eine haploide Vierfachdeletion wurde durch Kreuzung der beiden resultierenden Stämme mit nachfolgender Sporulierung und Tetradenanalyse hergestellt.

Die Deletionsmutanten sollten auf ihr Wachstumsverhalten auf verschiedenen Kohlenstoffquellen sowie auf Unterschiede im mitochondrialen Pyruvattransport und in der Pyruvatveratmung untersucht werden. Defekte in diesen Prozessen wären ein

Hinweis auf eine Rolle der von den ORFs codierten Proteine beim Transport von Pyruvat in die Mitochondrien.

## 5.2 Ergebnisse

### 5.2.1 Atmungsaktivität von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* mit Deletionen von YDL198c, YER053c, YOR222w und YPL134c

Aus *S. cerevisiae* Wildtypzellen ("WT"), Zellen mit einer YDL198c/YER053c-Doppeldeletion ("ERDL") und Zellen mit einer YOR222w/YPL134c-Doppeldeletion ("PLOR"), wurden nach Anzucht in YPG-Medium die Mitochondrien isoliert. Anschließend wurde die Atmungsaktivität der Mitochondrien mit verschiedenen Substraten gemessen. In Abbildung 16 ist eine beispielhafte Messung gezeigt.

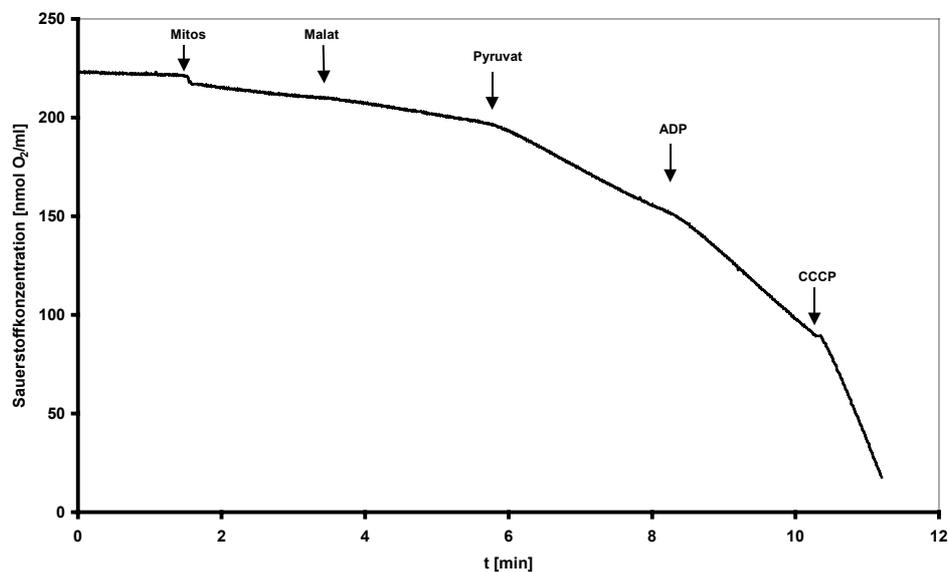


Abbildung 16: Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 ERDL,  $T = 30^{\circ}\text{C}$ . Zu 2 ml Mitochondrienpuffer wurden nacheinander gegeben: Mitochondrien (300  $\mu\text{g}$  Protein), 0,5 mM Malat, 0,5 mM Pyruvat, 0,2 mM ADP, 25  $\mu\text{M}$  CCCP.

Tabelle 19: Spezifische Atmungsaktivität der Mitochondrien im in Abbildung 16 gezeigten Experiment.

	Atmungsrate [ $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ]
Mitochondrien (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	32
+ 0,5 mM Malat	46
+ 0,5 mM Pyruvat	141
+ 0,2 mM ADP	230 (RCF = 1,6)
+ 25 $\mu\text{M}$ CCCP	601

Die gemessenen Werte für den Atmungskontrollfaktor (*respiratory control factor*, RCF) lagen zwischen 1,0 und 1,8. Es zeigte sich kein Unterschied der spezifischen Atmungsraten mit 0,5 mM Malat und 0,5 mM Malat + 0,5 mM Pyruvat (Abbildung 17). Die vier deletierten ORFs scheinen also nicht am Transport von Malat oder Pyruvat

beteiligt zu sein. Auch die maximale spezifische Atmungsaktivität mit 0,5 mM Malat und Pyruvat, entkoppelt mit 25  $\mu$ M Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon (CCCP), war nicht unterschiedlich: sie betrug  $(500 \pm 140)$   $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  für WT,  $(550 \pm 120)$   $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  für ERDL-Mitochondrien und  $(560 \pm 90)$   $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  für PLOR-Mitochondrien. Die Atmungskette scheint also bei den Deletionsmutanten nicht geschädigt zu sein.

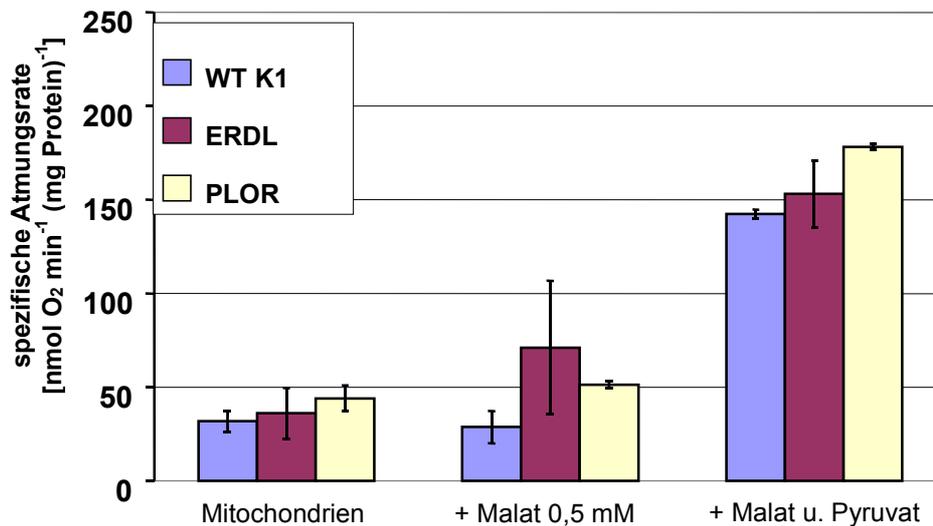


Abbildung 17: Spezifische Atmungsrate von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* in Mitochondrienpuffer mit verschiedenen Substraten.  $T = 30^\circ\text{C}$ . Fehlerbalken: SD mehrerer Messungen der gleichen Präparation.

### 5.2.2 Wachstum von *S. cerevisiae* mit Deletionen von YDL198c, YER053c, YOR222w und YPL134c

#### 5.2.2.1 Wachstum in Vollmedium

Um Hinweise auf eine mögliche Funktion der deletierten ORFs im Kohlenhydratstoffwechsel von Hefezellen zu erhalten, wurden *S. cerevisiae* Wildtypzellen, ERDL-, PLOR- und „4xD“-Zellen (in denen alle 4 ORFs deletiert waren) in Vollmedium mit Glucose (YPD), Glycerin (YPG) oder Ethanol (YPE) als Kohlenstoffquelle kultiviert. Die Wachstumskurven sind in Abbildung 18 bis Abbildung 20 dargestellt.

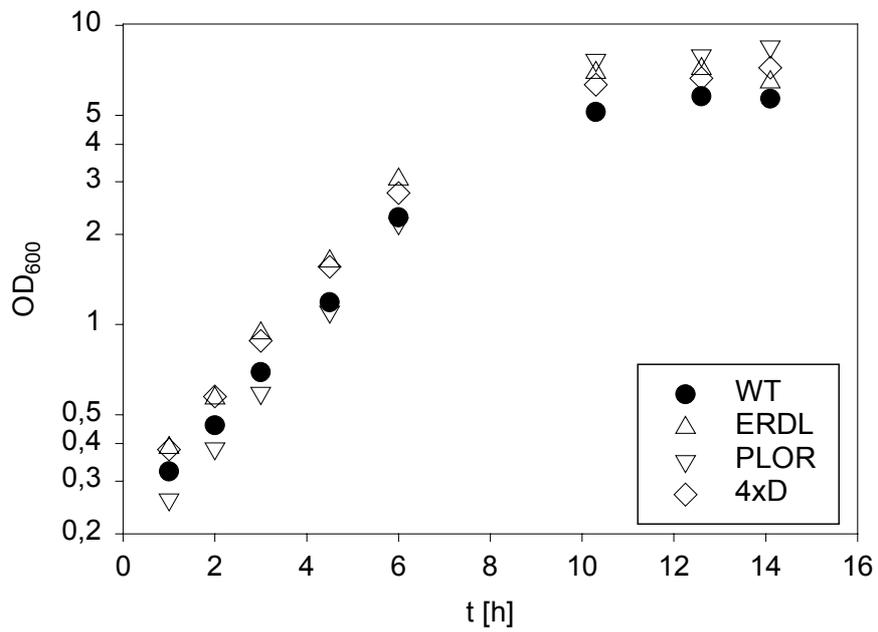


Abbildung 18: Wachstum von *S. cerevisiae* in YPD-Medium.

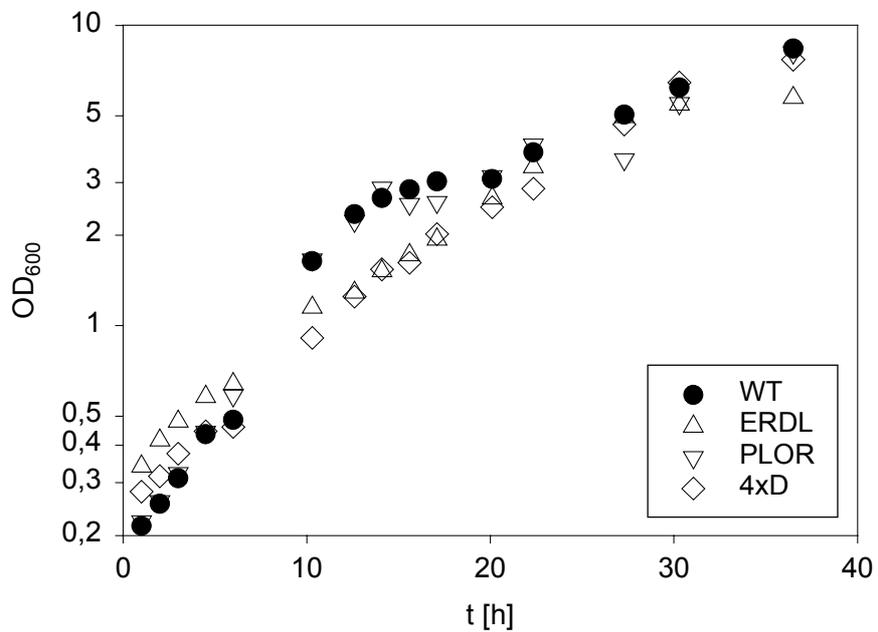


Abbildung 19: Wachstum von *S. cerevisiae* in YPG-Medium.

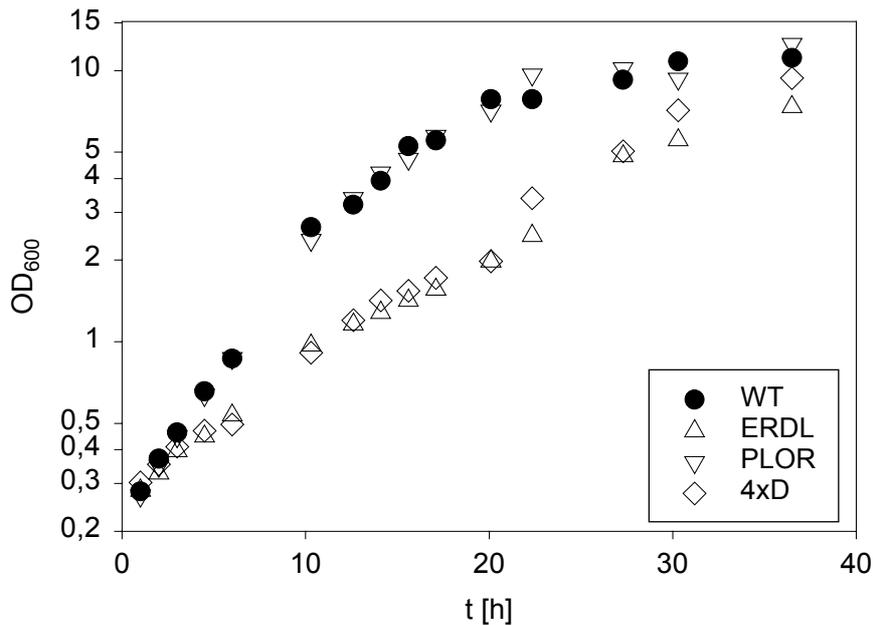


Abbildung 20: Wachstum von *S. cerevisiae* in YPE-Medium.

Tabelle 20: Verdopplungszeit  $t_D$  während der exponentiellen Wachstumsphase von *S. cerevisiae* in Vollmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

Verdopplungszeit $t_D$ [h]	YPD	YPG	YPE
WT K26	1,7	2,9	2,8
PLOR	1,6	3,0	3,0
ERDL	1,7	7,6	8,3
4xD	1,8	7,2	6,6

Bei Wachstum in YPD-Medium hatten die Deletionsmutanten keinen Wachstumsvorteil, bei Wachstum auf den zwei nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen Glycerin und Ethanol zeigte die Vierfachdeletion ein deutlich langsames Wachstum, das im gleichen Maße auch schon bei der ERDL-Doppeldeletion zu sehen war. Die PLOR-Doppeldeletion wuchs so schnell wie der Wildtyp auf allen drei Kohlenstoffquellen.

### 5.2.2.2 Wachstum in Minimalmedium

Obwohl das Gen für den Pyruvatcarrier offensichtlich nicht unter den vier deletierten Genen zu finden war (s. 5.2.1), machte der deutliche Phänotyp der ERDL- und 4xD-Zellen eine weitere Untersuchung dieser Mutanten lohnend. *S. cerevisiae* WT, ERDL-, PLOR- und 4xD-Zellen wurden in Minimalmedium mit Glucose, Glycerin oder Ethanol als Kohlenstoffquelle kultiviert. Auch in Minimalmedium verhielt sich die PLOR-Deletion wie der Wildtyp, während die ERDL-Deletion und die Vierfachdeletion nicht nur auf Glycerin oder Ethanol, sondern auch auf Glucose sehr viel langsamer wuchsen (nicht gezeigt, vgl. unten). Da die PLOR-Deletion keinen vom WT abweichenden Phänotyp zeigte, wurde sie in den weiteren Wachstumsexperimenten nicht untersucht. Die Vierfachdeletion wurde ebenfalls nicht weiter untersucht, weil sie sich in allen bisherigen Versuchen wie die ERDL-Deletion ver-

halten hatte. Für die weiteren Wachstumsexperimente wurden also nur noch Wildtypzellen (K1) und die ERDL-Deletion (aus K1 hervorgegangen) verwendet.

In Minimalmedium war der Wachstumsnachteil der ERDL-Deletion sehr viel stärker. Da der Wachstumsnachteil auf Glucose in Vollmedium nicht zu beobachten war, mussten die Zellen etwas aus dem Vollmedium aufgenommen haben, das die deletierten Gene unter diesen Bedingungen unnötig machte. Wenn diese(r) Stoff(e) dem Minimalmedium zugesetzt würde(n), müssten die Zellen auf Glucose wie Wildtypzellen wachsen, auf Glycerin und Ethanol müssten sie ebenfalls schneller wachsen können. Im folgenden wurde versucht, diesen Stoff zu finden.

### 5.2.3 Die Einzeldelentionsmutante K1 $\Delta$ YDL198c (*yhm1*)

Um zu ermitteln, ob die Deletion von YER053c oder YDL198c für den Phänotyp der ERDL-Doppelmutante verantwortlich war, wurden Wachstumsexperimente mit der Einzeldelention K1 YDL198c::*kanMX4* (*yhm1*) durchgeführt. Die Einzeldelention  $\Delta$ YER053c stand nicht zur Verfügung, da die ERDL-Doppeldeletion auf der Grundlage der YDL198c-Einzeldelention im Labor Boles hergestellt worden war. In den folgenden Experimenten zeigte sich dann, dass allein die Deletion von YDL198c für den vom WT abweichenden Phänotyp der ERDL-Zellen verantwortlich war.

In Minimalmedium mit der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle Ethanol konnten die *yhm1*-Zellen nur langsam wachsen (vgl. unten). In Minimalmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle wuchs die Deletionsmutante viel langsamer als der WT, Zugabe von entweder Hefeextrakt oder Pepton in der in YPD-Medium vorhandenen Endkonzentration steigerte die Wachstumsrate fast auf das Niveau des Wildtyps in Minimalmedium mit Glucose (Tabelle 21).

*Tabelle 21: Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Phase von S. cerevisiae K1 WT und yhm1-Zellen in CBS-Minimalmedium mit 2% Glucose („CBS2D“) als Kohlenstoffquelle mit Hefeextrakt („Y“) und/oder Bacto-Pepton („P“) als Ergänzung, bzw. in YPD-Vollmedium. Werte  $\pm$  SD der mathematischen Anpassung.*

Stamm	Medium	Verdopplungszeit $t_D$ [h]
K1 WT	YPD	$1,6 \pm 0,1$
K1 WT	CBS2D	$2,3 \pm 0,1$
<i>yhm1</i>	YPD	$1,9 \pm 0,2$
<i>yhm1</i>	CBS2D	$13 \pm 1$
<i>yhm1</i>	CBS2D + Y	$2,6 \pm 0,2$
<i>yhm1</i>	CBS2D + P	$2,9 \pm 0,2$
<i>yhm1</i>	CBS2D + Y + P	$2,9 \pm 0,2$
<i>yhm1</i>	Y + P + D	$2,3 \pm 0,2$

Auch die Zugabe der Aminosäuremischung für YNB-Medium (Sherman 1991) zum CBS-Minimalmedium beschleunigte die Verdopplungsrate der *yhm1*-Zellen fast auf Wildtypniveau:  $t_D = 2-3$  h. Das Wachstum von Wildtypzellen wurde dagegen durch Aminosäurezugabe kaum noch beschleunigt:  $t_D(\text{YNB2D}(-\text{AA})) = 2,5$  h,  $t_D(\text{YNB2D}+\text{AA}) = 2,3$ h.

### 5.2.4 Welche Aminosäuren fördern das Wachstum von *S. cerevisiae yhm1* auf Minimalmedium mit Glucose?

Nachdem gezeigt war, dass die Aminosäuremischung für YNB-Medium das Wachstum der *yhm1*-Zellen in Minimalmedium mit Glucose auf Wildtypniveau heben konnte, wurde versucht, die Komponente in dieser Aminosäuremischung zu finden, die für diesen Effekt verantwortlich war. Dazu wurden die in der Mischung enthaltenen Komponenten (Adeninsulfat, Uracil und 14 Aminosäuren) zunächst in vier Gruppen eingeteilt und diese Gruppen einzeln dem YNB2D(-AA)-Medium zugesetzt. Uracil war immer enthalten, da der Hefestamm K1 Uracil-auxotroph ist. Die Ergebnisse des Wachstumsversuchs sind in Abbildung 21 und Tabelle 22 dargestellt.

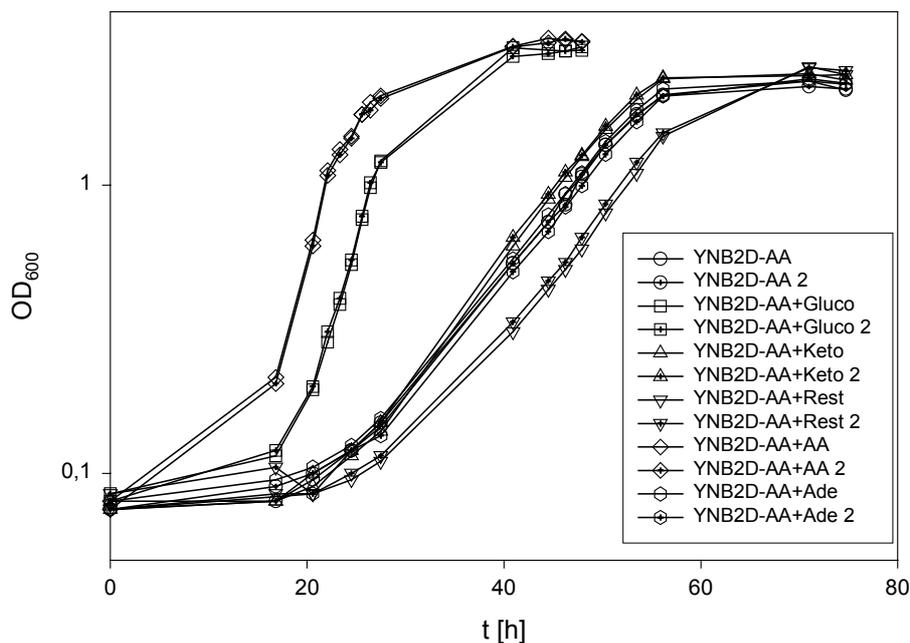


Abbildung 21: Wachstum von *S. cerevisiae yhm1* in YNB(-AA)-Medium mit 2% Glucose und verschiedenen Zusätzen. Je 2 Wachstumskurven pro Zusatz. Gluco: Arg, His, Met (je 20 µg/ml), Asp, Glu (je 100 µg/ml), Val (150 µg/ml), Ser (400 µg/ml). Keto: Ile, Leu, Lys (je 30 µg/ml). Rest: Trp (20 µg/ml), Tyr (30 µg/ml), Phe (50 µg/ml), Thr (200 µg/ml). AA: alle 14 Aminosäuren in den angegebenen Konzentrationen. Ade: Adeninsulfat (20 µg/ml).

Tabelle 22: Wachstumsgeschwindigkeit in der exponentiellen Phase von *S. cerevisiae yhm1* in YNB(-AA)-Medium mit 2% Glucose und verschiedenen Zusätzen.

Zusatz zu YNB2D(-AA)	$t_D \pm SD$ aus Doppelbestimmung [h]
kein Zusatz	$6,8 \pm 0,1$
Ade	$7,0 \pm 0,1$
Ile, Leu, Lys	$7,1 \pm 0,3$
Phe, Thr, Trp, Tyr	$6,15 \pm 0,05$
Arg, Asp, Glu, His, Met, Ser, Val	$2,2 \pm 0,0$
14 Aminosäuren (Sherman 1991)	$1,85 \pm 0,05$

Es ist deutlich zu sehen, dass Zugabe von Isoleucin, Leucin und Lysin, von Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin und Threonin, bzw. von Adenin die Wachstumsgeschwindigkeit der *yhm1*-Zellen in YNB2D-AA-Medium nicht erhöhte. Bei Zugabe von

Arginin, Histidin, Methionin, Aspartat, Glutamat, Valin und Serin wuchsen die Zellen fast so schnell wie bei Zugabe der gesamten Aminosäuremischung. Deshalb wurden diese Aminosäuren dann einzeln dem YNB2D(-AA)-Medium zugegeben und das Wachstum der *yhm1*-Zellen erneut verfolgt. Dabei zeigte sich, dass Arginin der Bestandteil war, der zur Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit führte (s.u.).

Um zu beweisen, dass Argininzugabe ausreichte, das Wachstum der *yhm1*-Zellen auf WT-Niveau zu beschleunigen, wurde das in Abbildung 22 gezeigte Experiment durchgeführt. Die *yhm1*-Zellen wurden in YNB2D(-AA)-Medium ohne Ergänzung, mit allen 14 Aminosäuren aus der SC-Mischung, mit allen Aminosäuren nach Sherman (1991) ohne Arginin, und nur mit Argininzugabe kultiviert. Alle 14 Aminosäuren brachten die Wachstumsgeschwindigkeit auf das Wildtypniveau von 2 h, Argininzugabe brachte die Verdopplungszeit fast auf den gleichen Wert (2,9 h), die 13 Aminosäuren ohne Arginin hatten dagegen fast keinen Effekt ( $t_D = 5,0$  h). Damit wurde eine Arginin-Bradyprophie als Phänotyp der *yhm1*-Zellen gezeigt: ohne Arginin wuchs die Mutante nur langsam (griech. *bradys* = langsam).

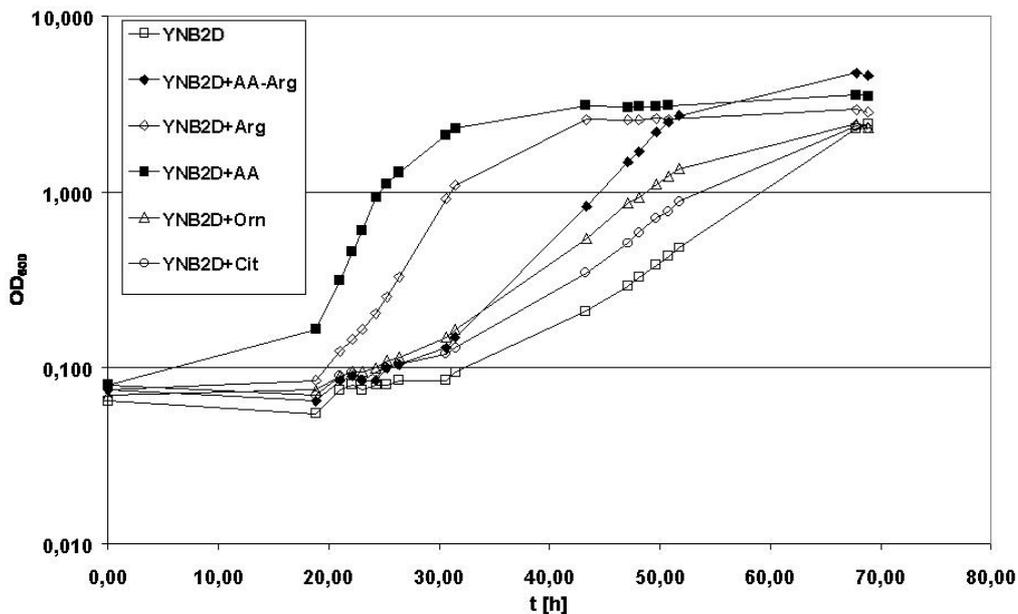


Abbildung 22: Wachstum von *S. cerevisiae* K1 *yhm1* in YNB-Medium ohne Aminosäuren mit 2% Glucose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Aminosäurezusätzen. Die Kolben wurden mit einer  $OD_{600}$  von 0,075 angeimpft.

## Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie

---

Tabelle 23: Wachstumsgeschwindigkeiten in der exponentiellen Phase zu Abbildung 22,  $\pm$  SD aus Anpassung mit SigmaPlot. Wachstum von *S. cerevisiae* K1 yhm1 bei 30°C in YNB(-AA)-Medium ohne Aminosäuren mit 2% Glucose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Aminosäurezusätzen.

Zusatz zu YNB2D(-AA)	$t_D$ [h]
kein Zusatz	6,5 $\pm$ 0,05
Citrullin (20 $\mu$ g/ml)	6,3 $\pm$ 0,3
Ornithin (20 $\mu$ g/ml)	6,6 $\pm$ 0,2
13 AS ohne Arg (1,2 mg/ml)	5,0 $\pm$ 0,3
Arg (20 $\mu$ g/ml)	2,9 $\pm$ 0,03
alle 14 AS (1,2 mg/ml)	2,0 $\pm$ 0,03

Ein Grund dafür könnte eine gestörte Argininsynthese sein. Ein Teil der Argininsynthese findet im Cytosol, ein Teil in den Mitochondrien statt, die Beteiligung von mitochondrialen Transportproteinen ist also gefordert. In Bäckerhefe finden die Syntheseschritte vom Glutamat bis zum Ornithin in den Mitochondrien statt, das Ornithin wird dann aus den Mitochondrien heraustransportiert und durch den vollständig im Cytosol lokalisierten Harnstoffzyklus über Citrullin zu Arginin umgewandelt (zur Übersicht Cooper 1982 und Abbildung 30). Zwei mögliche Funktionen für Yhm1p, die beide in direktem Zusammenhang mit der Argininsynthese stehen, wären also der Transport von Glutamat in die mitochondriale Matrix hinein, oder der Transport von Ornithin aus der mitochondrialen Matrix heraus. In beiden Fällen sollte eine Supplementierung des Mediums mit Ornithin oder Citrullin den gleichen Effekt haben wie eine Supplementierung mit Arginin, da für die Reaktionsschritte vom Ornithin zum Arginin keine Transportprozesse nötig sind. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, hatte die Zugabe von Ornithin oder Citrullin jedoch keinen wachstumsfördernden Einfluss. Um auszuschließen, dass der fehlende Effekt von Ornithin und Citrullin auf die fehlende Aufnahme dieser Stoffe in die Zelle zurückzuführen war, wurden Experimente mit Ornithin, Citrullin und Arginin als einziger N-Quelle durchgeführt. Da die Hefezellen in diesem Fall auf die Aufnahme der jeweiligen Aminosäure angewiesen waren, mussten sie die entsprechenden Aufnahmesysteme exprimieren. Bei vorhandener Aufnahme war mit Citrullin als N-Quelle kein Wachstumsnachteil der *yhm1*-Zellen im Vergleich zum WT zu beobachten, auch mit Ornithin als N-Quelle war die Wachstumsgeschwindigkeit der *yhm1*-Zellen fast so groß wie die der WT-Zellen (Abbildung 23 und Tabelle 24).

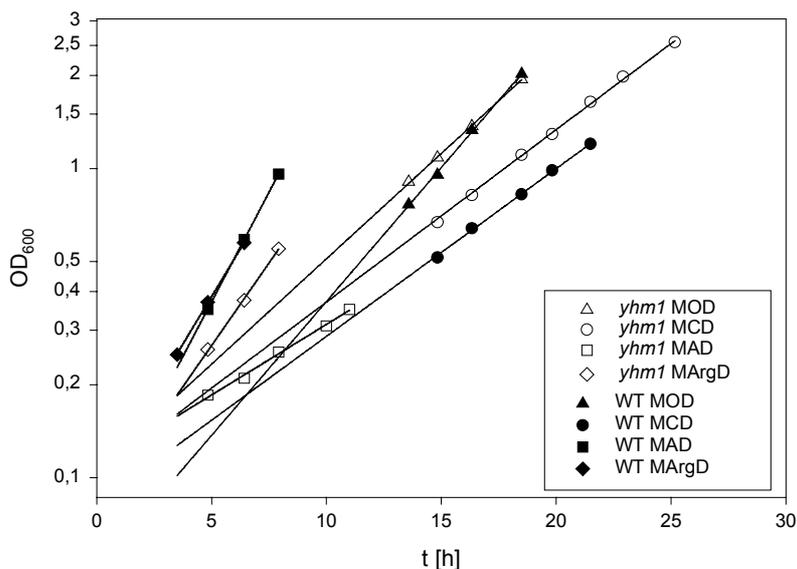


Abbildung 23: Wachstum von *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1* in der exponentiellen Wachstumsphase in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium ohne Aminosäuren mit Glucose als C-Quelle und verschiedenen N-Quellen. MOD: 1 g/l Ornithin-HCl, MCD: 1 g/l Citrullin, MAD: 5 g/l Ammoniumsulfat, MArgD: 1 g/l Arginin-HCl.

Tabelle 24: Verdopplungszeiten  $t_D$  [h] zu Abbildung 23.

	K1 WT	<i>yhm1</i>
MAD	2,1	6,2
MOD	3,5	4,4
MCD	5,6	5,4
MArgD	2,5	2,8

Die Fähigkeit von Ornithin und Citrullin, bei erfolgter Aufnahme in die Zelle, das Fehlen von *YHM1* auszugleichen, bestätigt die Rolle von Yhm1p im Argininstoffwechsel und unterstützt die Hypothese, dass der Defekt im Argininstoffwechsel auf dem Weg vom Glutamat zum cytoplasmatischen Ornithin liegt.

### 5.2.5 Wachstum von *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1* in verschiedenen Medien

WT- und *yhm1*-Zellen wurden nach Vorkultur in YPD-Medium in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium kultiviert, bei dem Stickstoffquelle und Kohlenstoffquelle variiert wurden. Die ermittelten Verdopplungszeiten sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

## Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie

Tabelle 25: Wachstumsgeschwindigkeit von WT- und *yhm1*-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase. Die Zellen wurden in 20 ml YNB(-AA)-Medium mit den entsprechenden Zusätzen (je 20 mg/l) kultiviert. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils mehreren Wachstumsexperimenten.

C-Quelle	N-Quelle	Zusätze	t <sub>D</sub> in der log-Phase [h]	
			WT	<i>yhm1</i>
Glucose	Ammonium	-	2	6
Glucose	Ammonium	Arg	2	2
Glucose	Ammonium	Pro	2	6
Glucose	Arginin	-	2	2
Glucose	Prolin	-	3	6
Glucose	Prolin	Arg	3	5
Ethanol	Ammonium	-	4	9
Ethanol	Ammonium	Arg	4	5
Ethanol	Ammonium	Pro	4	9
Ethanol	Ammonium	Pro+Arg	4	5
Ethanol	Prolin	-	5	10
Ethanol	Prolin	Arg	5	10

Der Wachstumsdefekt der *yhm1*-Zellen bei Wachstum auf Glucose und Ammonium wurde durch Zusatz von 20 mg/l Arginin fast vollständig behoben. Dieser Wachstumsdefekt trat auch bei Prolin als Stickstoffquelle auf, hier konnte Argininzugabe die Wachstumsgeschwindigkeit aber kaum anheben. Auch mit Ethanol als Kohlenstoffquelle wuchsen die *yhm1*-Zellen etwa halb so langsam wie die WT-Zellen, auch hier konnte Argininzugabe die Wachstumsgeschwindigkeit nicht völlig auf Wildtypniveau bringen. Wenn die Kohlenstoffquelle und die Stickstoffquelle, auf denen Argininzugabe kein Wildtypwachstum wiederherstellen konnte, kombiniert wurden, hatte Argininzugabe keinen wachstumsbeschleunigenden Effekt.

### 5.2.5.1 Einfluss von Prolin auf die Arginin-Verwertung

Bei Wachstum mit Glucose als C-Quelle und Prolin als N-Quelle konnte Argininsupplementation das Wachstum der *yhm1*-Zellen nicht auf Wildtypniveau bringen. Dieser Unterschied zum Wachstum mit Ammonium als N-Quelle ließe sich erklären, wenn Prolin allgemein die Argininverwertung hemmen würde. Eine enge Verbindung der beiden Aminosäuren im Stoffwechsel ist gegeben, da Prolin ein Zwischenprodukt des Argininabbaus ist (Brandriss & Magasanik 1980). Um dieser Frage nachzugehen, wurden Hefezellen mit Arginin als N-Quelle und verschiedenen Konzentrationen von Prolin kultiviert. Die Verdopplungszeiten in der exponentiellen Wachstumsphase wurden ermittelt und sind in Tabelle 26 gezeigt. Weder bei den Wildtyp-, noch bei den *yhm1*-Zellen konnte ein hemmender Einfluss der Prolinkonzentration auf die Wachstumsgeschwindigkeit beobachtet werden.

Ein hemmender Einfluss des Prolins auf die Argininverwertung ist also nicht der Grund für das auch mit Argininsupplementation im Vergleich zu WT-Zellen langsamere Wachstum der *yhm1*-Zellen in MPD-Medium.

Tabelle 26: Verdopplungszeiten in der exponentiellen Wachstumsphase von *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1* in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium mit 1 g/l Arg-HCl als N-Quelle und verschiedenen Konzentrationen von Prolin.

c (Pro) [g/l]	t <sub>D</sub> K1 WT	t <sub>D</sub> <i>yhm1</i>
0	1,81	1,98
0,02	1,80	1,91
0,2	1,76	1,95
1	1,77	1,93
5	1,74	1,97

Aus Tabelle 26 wird außerdem deutlich, dass die *yhm1*-Zellen mit Arginin als Stickstoffquelle etwas langsamer als WT-Zellen wuchsen. Beim erneuten Sichten aller bisherigen Wachstumsversuche fiel ein leichter Wachstumsnachteil der *yhm1*-Zellen mit Argininsupplementation oder Arginin als N-Quelle bei fast allen Versuchen auf (siehe z.B. auch Tabelle 27). Dieser Unterschied in der Verdopplungszeit von 0,05 bis 0,3 h war als nicht signifikant betrachtet und nicht weiter verfolgt worden. Argininzugabe brachte das Wachstum der *yhm1*-Zellen also nicht vollständig auf WT-Niveau. Die Klassifizierung des Phänotyps als Arginin-Bradytrophie ist trotzdem gültig, zumal ein so geringer Unterschied der Wachstumsraten bei Wachstum auf Platten nicht beobachtbar ist. Gleiches Wachstum auf Platten wird aber oft als ausreichendes Kriterium zur Definition von WT-Wachstum verwendet (z.B. Cho *et al.* 1998a).

### 5.2.6 Veratmung von Prolin und Glutamat durch Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1*

Eine mögliche Funktion von Yhm1p könnte der Transport von Glutamat in die Mitochondrien sein. Ein gestörter Transport von Glutamat in die Mitochondrien würde die Synthese von Arginin behindern und so vielleicht zur beobachteten Arginin-Bradytrophie führen. Eine zweite mögliche Funktion ergab sich aus der Beobachtung, dass die *yhm1*-Zellen Prolin als Stickstoffquelle schlecht verwerten konnten. Die Verwertung von Prolin geschieht durch Transport des Prolins in die mitochondriale Matrix, wo es über die Zwischenstufe  $\Delta^1$ -Pyrrolinecarboxylat in Glutamat umgewandelt wird (zur Übersicht Hofman-Bang 1999). Ein Fehlen des Prolintransporters in der inneren Mitochondrienmembran würde eine Verwertung von Prolin als Stickstoffquelle unmöglich machen. Als eine Möglichkeit, den Transport von Prolin und Glutamat in die Mitochondrien zu messen, wurde versucht, die Veratmung dieser beiden Substrate durch isolierte Mitochondrien zu messen.

Auch Wildtyp-Mitochondrien reagierten auf Zugabe von Prolin zum Messpuffer kaum mit einer Erhöhung der Atmungsaktivität. Erst bei Konzentrationen ab 5 mM konnte man eine Erhöhung der Atmungsrate messen. In der Literatur wurden bei der Messung der Prolinveratmung von Mitochondrien aus Insektenflugmuskel, Fischmuskel oder Tintenfischherz ebenfalls Konzentrationen ab 5 mM eingesetzt. Die Anwesenheit von 0,5-5 mM Pyruvat im Messpuffer ist bei einigen Organismen notwendig, bei anderen nicht (z.B. Mommsen und Hochachka 1981, Moyes *et al.* 1989). Daten zur Prolinveratmung von Hefemitochondrien sind nicht veröffentlicht. Bei Wildtyp- und *yhm1*-Mitochondrien konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung des Sauerstoffverbrauchs bei Prolinzugabe mit und ohne Pyruvat gemessen werden.

Durch die insgesamt sehr geringe Atmungsaktivität von höchstens  $10 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$  konnten aber keine Aussagen über einen Unterschied zwischen WT und *yhm1* getroffen werden. Selbst ein vorhandener Unterschied würde wohl bei den verwendeten Prolinkonzentrationen von 5-20 mM keine Aussage über einen Transportprozess erlauben, da bei diesen unphysiologischen Konzentrationen unspezifischer Transport bzw. Diffusion eine Rolle spielen könnte.

Auch Glutamat erhöhte die Atmungsaktivität von isolierten Hefemitochondrien nur schwach. In reinem Mitochondrienpuffer konnte keine Atmungssteigerung bei Zugabe von 0,5 mM Glutamat gemessen werden. In Anwesenheit von 0,5 mM Malat war eine schwache Atmungssteigerung messbar. Bei Wildtypmitochondrien konnte eine konzentrationsabhängige Atmungssteigerung durch Zugabe von 0,5-5 mM Glutamat in Anwesenheit von 0,5 mM Malat gemessen werden, bei *yhm1*-Mitochondrien führte die Zugabe von bis zu 5 mM Glutamat nicht zu einer Atmungssteigerung. Die insgesamt sehr niedrigen Werte ( $V_{\text{max}}(\text{Glutamat}) \approx 10 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , zum Vergleich  $V_{\text{max}}(\text{Pyruvat}) \approx 80 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) machen aber auch hier eine Aussage schwierig. Die Glutamatveratmung der *yhm1*-Zellen könnte beeinträchtigt sein, was auf eine Funktion von Yhm1p als Glutamattransporter hindeuten würde.

### 5.2.7 Deletion von *ORT1* in WT und *yhm1*-Hefezellen

Um weitere Informationen über die Funktion von Yhm1p zu erhalten, wurde das Gen *ORT1* (YOR130c, vormals *ARG11* genannt) in Wildtypzellen und *yhm1*-Zellen deletiert. *ort1*-Zellen zeigen ebenfalls eine Arginin-Bradytrophie (Crabeel *et al.* 1996). Ort1p katalysiert im rekonstituierten System den Transport von Ornithin, Lysin und Arginin als homologen Austausch und als z.B. Ornithin/ $\text{H}^+$ -Austausch (Palmieri *et al.* 1997a). Bei aus *ort1*-Zellen isolierten Mitochondrien wurde aber immer noch Arginin- und Ornithinaufnahme mit Wildtypcharakteristika gezeigt (Soetens *et al.* 1998). Die Autoren schlossen, dass es außer Ort1p noch einen weiteren mitochondrialen Transporter für Ornithin und Arginin geben muss, den sie „Bac1p“ nannten (*basic amino acid carrier*). Dem Verdacht, dass es sich bei Yhm1p um „Bac1p“ handelt, sollte mit der Herstellung der *yhm1/ort1*-Doppeldelation nachgegangen werden. Falls es sich bei Yhm1p um „Bac1p“ handelt, und es keine weiteren mitochondrialen Ornithin-Carrier gibt, sollten Mitochondrien aus *yhm1*-Zellen sich ähnlich verhalten wie Mitochondrien aus *ort1*-Zellen. Außerdem sollte dann aus der Arginin-Bradytrophie von *ort1*- und *yhm1*-Zellen bei der Doppeldelation eine Arginin-Auxotrophie werden.

Das ORF von *ORT1* wurde in WT-Zellen und in *yhm1*-Zellen durch das *kanMX4*-Modul (Güldener *et al.* 1996) ersetzt. Dazu musste im Fall der *yhm1*-Zellen das dort schon vorhandene *kanMX4*-Modul erst wieder entfernt werden, um erneut auf Geneticin-Resistenz selektionieren zu können. Die korrekte Insertion der *kanMX4*-Kassette wurde mit PCR nachgewiesen (Abbildung 24).

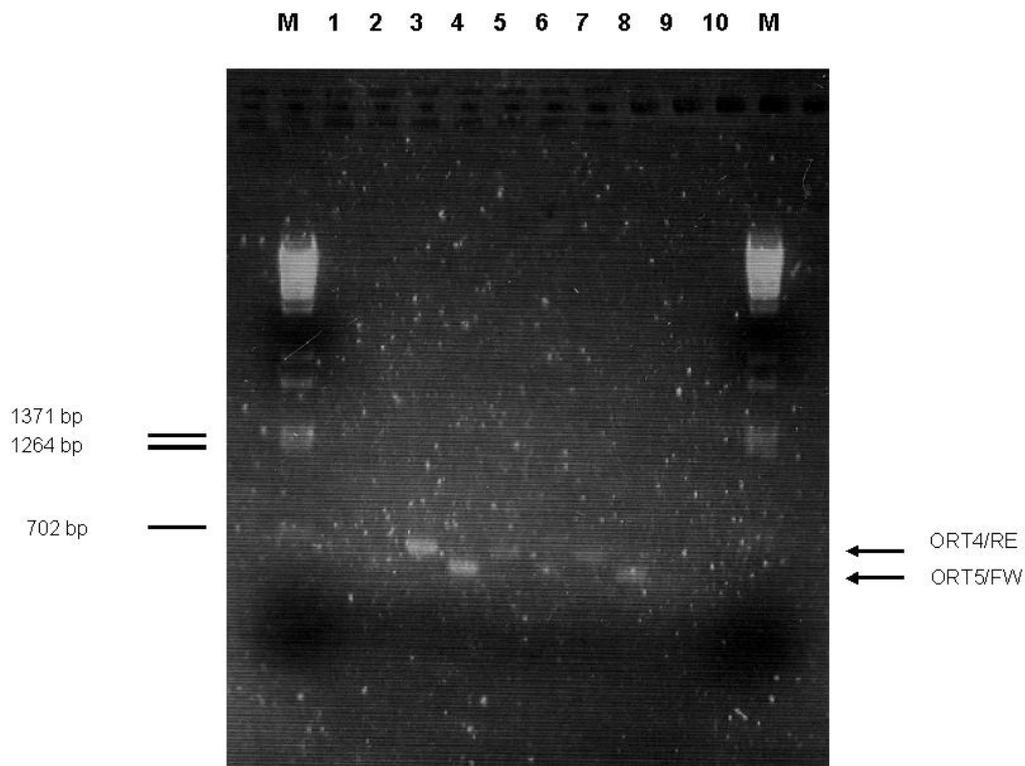


Abbildung 24: Colony-PCR-Nachweis der erfolgreichen Deletion von ORT1 durch Ersetzung mit dem kanMX4-Modul in WT- und  $\Delta$ YHM1-Zellen.

M: 0,5  $\mu$ g  $\lambda$ Eco91I, 1 u. 3: je 1 Kolonie K1  $\Delta$ YHM1/ORT1::kanMX4 mit dem Primerpaar ORT4/RE, 2 u. 4: je 1 Kolonie K1  $\Delta$ YHM1/ORT1::kanMX4 mit dem Primerpaar ORT5/FW, 5 u. 7: je 1 Kolonie K1 ORT1::kanMX4 mit dem Primerpaar ORT4/RE, 6 u. 8: je 1 Kolonie K1 ORT1::kanMX4 mit dem Primerpaar ORT5/kanFW, 9: 1 Kolonie K1 WT mit dem Primerpaar ORT4/kanRE, 10: 1 Kolonie K1 WT mit dem Primerpaar ORT5/FW.

Erwartete PCR-Produktgrößen: Primerpaar ORT4/RE: 638 bp, Primerpaar ORT5/FW: 567 bp. WT: kein PCR-Produkt.

## 5.2.8 Wachstum von *S. cerevisiae* K1 WT, *yhm1*, *ort1*, und *yhm1/ort1* in verschiedenen Medien

### 5.2.8.1 Wachstum von K1 WT-, *yhm1*-, *ort1*- und *yhm1/ort1*-Zellen

WT-, *yhm1*-, *ort1*- und *yhm1/ort1*-Zellen wurden nach Vorkultur in YPD-Medium in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium kultiviert, bei dem Stickstoffquelle und Kohlenstoffquelle variiert wurden. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Verdopplungszeit  $t_D$  ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

## Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie

Tabelle 27: Wachstumsgeschwindigkeit von WT-, *yhm1*-, *ort1*- und *yhm1/ort1*-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase. Die Zellen wurden in 20 ml Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Minimalmedium mit oder ohne 20 mg/l Arginin-HCl kultiviert.

C-Quelle	N-Quelle	Zusatz	$t_D$ in der log-Phase [h]			
			WT	<i>yhm1</i>	<i>ort1</i>	<i>yhm1/ort1</i>
Glucose	Ammonium	-	1,9	5,4	11	32
Glucose	Ammonium	Arg	1,9	2,2	2,2	2,2
Glucose	Prolin	-	3,2	8,7	14	35
Glucose	Prolin	Arg	3,1	5,1	5,1	5,3
Ethanol	Ammonium	-	4	8,8	19	49
Ethanol	Ammonium	Arg	4	7,1	5,8	7,5

Bei Variation von Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ohne weitere Zusätze war die Reihenfolge der Verdopplungszeiten immer  $WT < yhm1 < ort1 < yhm1/ort1$ . Das heißt, dass das Fehlen von *ORT1* unter den gewählten Wachstumsbedingungen die Zellen mehr im Wachstum behindert als das Fehlen von *YHM1*. Die Effekte der Deletion von *YHM1* und *ORT1* addierten sich in der Doppeldelentionsmutante, die extrem langsam wuchs. So wuchsen auf Glucose/Ammonium die *yhm1*-Zellen 2,8mal so langsam wie WT-Zellen, die *ort1*-Zellen 5,9mal so langsam, und die *yhm1/ort1*-Zellen 16,8mal so langsam ( $2,8 \times 5,9 = 16,2$ ). Auch bei Glucose/Prolin und Ethanol/Ammonium entsprach die Verlangsamung des Wachstums der *yhm1/ort1*-Zellen dem Produkt aus den "Verlangsamungsfaktoren" der Einzeldelitionen. Argininzugabe brachte, mit Glucose als Kohlenstoffquelle, das Wachstum aller Mutanten fast auf WT-Niveau. Mit Prolin als Stickstoffquelle oder Ethanol als Kohlenstoffquelle konnte Argininzugabe das Wachstum aller Mutanten zwar beschleunigen, aber nicht auf WT-Niveau bringen. Auffallend war, dass Argininzugabe die Wachstumsgeschwindigkeit der drei Mutanten auf das gleiche Niveau hob, mit Argininzugabe war es also unerheblich, ob *YHM1* oder *ORT1* fehlte, entscheidend für den verbleibenden Wachstumsdefekt war, dass eines der beiden ORFs deletiert war.

### 5.2.8.2 Wachstum von K1 WT-, *yhm1*- und *ort1*-Zellen mit Glutamat als N-Quelle

Da Glutamat der Ausgangspunkt der Argininsynthese von *S. cerevisiae* ist, wurde die Fähigkeit von K1 WT-, *yhm1*- und *ort1*-Zellen untersucht, Glutamat zu verstoffwechseln. Die Zellen wurden nach Vorkultur in YPD-Medium in Succinat-gepuffertem synthetischem Minimalmedium kultiviert. Dabei handelte es sich um YNB(-AA)-Medium mit 1 g/l Glutaminsäure als einziger Stickstoffquelle und 20 g/l Glucose als Kohlenstoffquelle. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Verdopplungszeit  $t_D$  ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 und Tabelle 28 gezeigt.

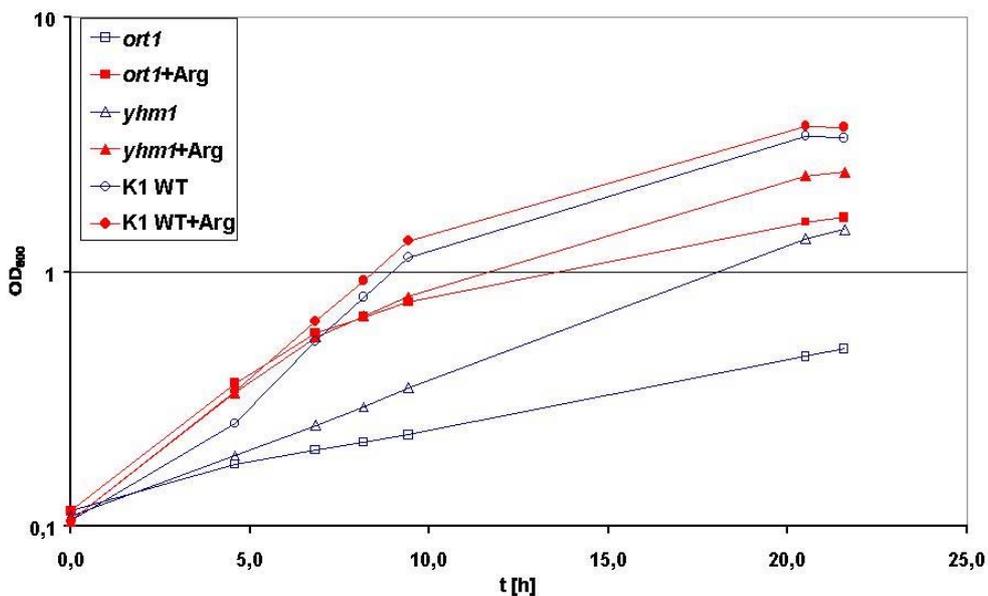


Abbildung 25: Wachstum von *S. cerevisiae* K1 WT, *yhm1* und *ort1* in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium mit 1 g/l L-Glutamat als einziger N-Quelle und 20 g/l Glucose als C-Quelle. +Arg: mit 20 mg/l L-Arginin-HCl.

Tabelle 28: Wachstumsgeschwindigkeit von WT-, *yhm1*-, *ort1*- und *yhm1/ort1*-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase, ermittelt mit SigmaPlot. Die Zellen wurden in 20 ml Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium mit 1 g/l Glutamat als einziger N-Quelle und 20 g/l Glucose als C Quelle (MGD-Medium) kultiviert. +Arg: mit 20 mg/l L-Arg-HCl

	WT		<i>yhm1</i>		<i>ort1</i>	
	$t_D$ [h]	OD <sub>600max</sub>	$t_D$ [h]	OD <sub>600max</sub>	$t_D$ [h]	OD <sub>600max</sub>
MGD	2,3	5	5,6	3	11	3
MGD+Arg	2,5	5	4,9	3	6,4	4

Auch mit Glutamat als Stickstoffquelle hatten die K1 *yhm1*- und K1 *ort1*-Zellen einen Wachstumsdefekt, der durch Argininzugabe nur teilweise aufgehoben wurde. *ort1*-Zellen wuchsen schlechter als *yhm1*-Zellen, mit und ohne Arginin.

### 5.2.9 Wachstum von BY-Zellen

Der schwächere Effekt der Argininsupplementation in Medien, die vom Standardmedium MAD abwichen, ließ sich nicht einfach erklären. Es stellte sich die Frage, ob der Wachstumsphänotyp von *yhm1*-Zellen (und auch *ort1*-Zellen) nur auf den Argininmangel der Zellen zurückzuführen war (der durch Supplementation behoben sein sollte), oder ob es noch andere Effekte der Deletion von *YHM1* bzw. *ORT1* gab. Hierzu sollte das Wachstum von *yhm1*-Zellen und *ort1*-Zellen mit dem von Zellen verglichen werden, bei denen die Argininsynthese durch Deletion eines Enzyms aus dem Syntheseweg gestört war. Wenn Argininmangel das einzige Problem der *yhm1*-Zellen wäre, sollte der Phänotyp dieser Zellen ähnlich aussehen, das heißt, z.B. *arg4*-, *arg6*- oder *arg7*-Zellen sollten mit Prolin als Stickstoffquelle oder Ethanol als Kohlenstoffquelle auch mit Argininsupplementation langsamer wachsen als der WT. Falls Argininsupplementation das Wachstum von z.B. *arg4*-Zellen in MAE-Medium

dagegen auf WT-Niveau anheben würde, spräche das für eine zusätzliche Funktion von *YHM1* unabhängig von der Argininsynthese.

Hefezellen mit einer Einzeldelation von z.B. *ARG4*, *ARG6* oder *ARG7* sollten von der Stammsammlung EUROSCARF in Frankfurt am Main bezogen werden, die u.a. Stämme aus den EUROFAN-Projekten mit Einzeldelationen aller ORFs des Hefegenoms zur Verfügung stellt (betreut von K.-D. Entian). Da die EUROFAN-Deletionsmutanten zwar auch durch Ersetzen der ORFs mit der *kanMX4*-Kassette, allerdings auf einem anderen Stammhintergrund hergestellt wurden, wurde zunächst der Wachstumsphänotyp der auf diesem Hintergrund hergestellten *yhm1*- und *ort1*-Zellen in einigen Medien untersucht, um sicher zu gehen, dass deren Phänotyp mit dem der bisher untersuchten *yhm1*- und *ort1*-Zellen übereinstimmte. Die von EUROSCARF bezogenen Hefemutanten waren mit dem "Wildtypstamm" BY 4741 hergestellt worden. Dieser haploide Stamm hat den gleichen Paarungstyp wie der Stamm K1 und hat zusätzlich zu einer Uracil-Auxotrophie noch Auxotrophien für Histidin, Leucin und Methionin. Diese drei Aminosäuren mussten bei der Kultivierung der BY-Zellen zusätzlich zugegeben werden.

Zunächst wurde das Wachstum von BY-, BY *yhm1*- und BY *ort1*-Zellen in verschiedenen Medien untersucht und mit dem der bisher untersuchten K1-Zellen verglichen. Um den Einfluss der drei Aminosäuren Histidin, Leucin und Methionin auf das Wachstum vom Einfluss der Deletion von *yhm1* oder *ort1* abzugrenzen, wurden in den Wachstumsversuchen auch der WT K1 und die mit K1 hergestellten *yhm1*- und *ort1*-Zellen unter Zusatz von 20 mg/l L-Histidin-HCl, 30 mg/l L-Leucin und 20 mg/l L-Methionin kultiviert. Die Zellen wurden nach Vorkultur in YPD-Medium in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium kultiviert, bei dem Stickstoffquelle und Kohlenstoffquelle variiert wurden. In der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Verdopplungszeit bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 29 und Tabelle 30 zusammengefasst.

## Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie

Tabelle 29: Verdopplungszeiten von *S. cerevisiae* BY während der exponentiellen Wachstumsphase in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium mit verschiedenen N- und C-Quellen. Arg: mit 20 mg/l L-Arg-HCl. k.W.: kein Wachstum.

Stamm	BY 4741 (+ His + Leu + Met)		t <sub>D</sub> in der log-Phase [h]		
	C-Quelle	N-Quelle	Zusatz	WT	<i>yhm1</i>
Glucose	Ammonium	-	1,9	14	16
Glucose	Ammonium	Arg	1,8	5	1,9
Glucose	Prolin	-	2,7	16	31
Glucose	Prolin	Arg	2,9	5,3	2,8
Ethanol	Ammonium	-	7,5	k.W.	39
Ethanol	Ammonium	Arg	7,9	k.W.	7,2

Tabelle 30: Verdopplungszeiten von *S. cerevisiae* K1 während der exponentiellen Wachstumsphase in Succinat-gepuffertem YNB(-AA)-Medium mit verschiedenen N- und C-Quellen. Arg: mit 20 mg/l L-Arg-HCl.

Stamm	K1 (+ His + Leu + Met)		t <sub>D</sub> in der log-Phase [h]		
	C-Quelle	N-Quelle	Zusatz	WT	<i>yhm1</i>
Glucose	Ammonium	-	1,8	5,1	16
Glucose	Ammonium	Arg	1,8	1,9	1,7
Glucose	Prolin	-	2,7	5,3	15
Glucose	Prolin	Arg	2,9	3,2	2,3
Ethanol	Ammonium	-	4,2	7,6	31
Ethanol	Ammonium	Arg	3,6	5,6	4,3

Das Wachstum der BY-Deletionsmutanten zeigte dramatische Unterschiede zum Wachstum der K1-Deletionsmutanten. Während (mit His, Leu und Met) das Wachstum der K1 *yhm1*-Zellen und der K1 *ort1*-Zellen in MAD-Medium durch Argininsupplementation auf WT-Niveau gebracht werden konnte, konnte das Wachstum der BY *yhm1*-Zellen im gleichen Medium nicht auf WT-Niveau gebracht werden. In allen drei getesteten Medien brachte Argininsupplementation das Wachstum der BY *ort1*-Zellen auf WT-Niveau, das Wachstum der BY *yhm1*-Zellen wurde gefördert, jedoch nicht bis auf WT-Niveau. Mit Ethanol als C-Quelle wuchsen die BY *yhm1*-Zellen überhaupt nicht. Auch nach 19 Tagen Kultivierung im Schüttelkolben fand kein Wachstum der BY *yhm1*-Zellen in MAE-Medium (ob mit oder ohne Arginin) statt.

Der Phänotyp der BY *yhm1*- und *ort1*-Zellen schwächt die Hypothese, dass Yhm1p und Ort1p eine ähnliche Funktion in der Zelle haben. BY *yhm1*-Zellen wuchsen zwar in Medium mit Argininsupplementation schneller, zeigten jedoch keine klassische Arginin-Bradytrophie, wie sie für *ort1*-Zellen beschrieben ist und auch in dieser Arbeit bei BY *ort1*-Zellen, K1 *ort1*-Zellen und K1 *yhm1*-Zellen zu beobachten war.

Das Phänomen, das mit den BY-Zellen näher untersucht werden sollte - Erreichen von WT-Wachstum von *yhm1*- und *ort1*-Zellen in MAD-Medium durch Argininsupplementation, kein WT-Wachstum von *yhm1*- und *ort1*-Zellen in argininsupplementiertem MPD- oder MAE-Medium - trat bei diesen Zellen nicht auf. Die

geplanten Experimente mit Zellen, denen Enzyme der Argininsynthese fehlten, wurden daraufhin aufgegeben.

### 5.2.10 Aminosäuregehalt von *S. cerevisiae* K1 WT, *yhm1*, *ort1*, und *yhm1/ort1*

Wegen der Parallelen im Wachstumsphänotyp der K1 *yhm1*-Zellen und *ort1*-Zellen wurde nach weiteren Parallelen zwischen beiden Deletionsmutanten gesucht. Ein weiteres Merkmal der *ORT1*-Deletion ist ein veränderter Aminosäurepool: Glutamat ist in dreifacher Menge vorhanden, Arginin um den Faktor 5 und Ornithin um den Faktor 10 reduziert (Delforge *et al.* 1975, Crabeel *et al.* 1996).

#### 5.2.10.1 Selektive Permeabilisierung von WT- und *yhm1*-Zellen

WT- und *yhm1*-Zellen wurden in MAD-Medium kultiviert, in der frühen logarithmischen Wachstumsphase geerntet und dann mit Nystatin selektiv permeabilisiert. Gesamtextrakte wurden mechanisch in einer Glasmühle hergestellt. Die Aminosäuren wurden per *high pressure liquid chromatography* (HPLC) aufgetrennt und identifiziert. Abbildung 26 zeigt die Analyse der cytosolischen Fraktion, Abbildung 27 die Analyse der organellären Fraktion. Die Vakuole nimmt etwa ein Viertel des intrazellulären Volumens ein (Kitamoto *et al.* 1988), das Volumen der anderen Organellen ist dagegen sehr viel kleiner (Mitochondrien nehmen z.B. 6-7 % des Zellvolumens ein bei Glucose oder Ethanol als C-Quelle, Visser *et al.* 1995). Gerade, was die Aminosäureverteilung angeht, kann man die Zusammensetzung der organellären Fraktion daher in guter Näherung mit der Zusammensetzung des Lumens der Vakuole gleichsetzen (Messenguy *et al.* 1980).

Man sah bei *yhm1*-Zellen im Vergleich zu WT-Zellen vor allem eine Verminderung des cytosolischen Gehalts an Serin, Glycin, Alanin, Valin, Ornithin und Prolin. In der Vakuole war der Gehalt an Arginin, Ornithin und Citrullin stark erniedrigt, Glutamat und Glutamin waren erhöht, außerdem war die Lysinkonzentration in der Vakuole stark erhöht (Abbildung 26 und Abbildung 27).

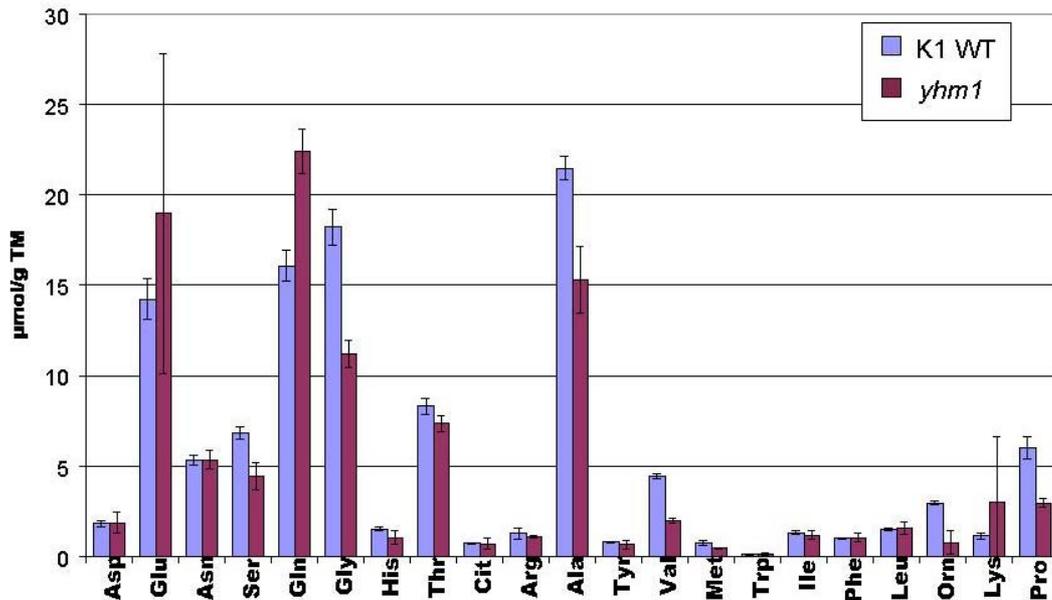


Abbildung 26: Cytosolischer Aminosäuregehalt von in MAD-Medium gewachsenen *S. cerevisiae* K1 WT- und *yhm1*-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase.

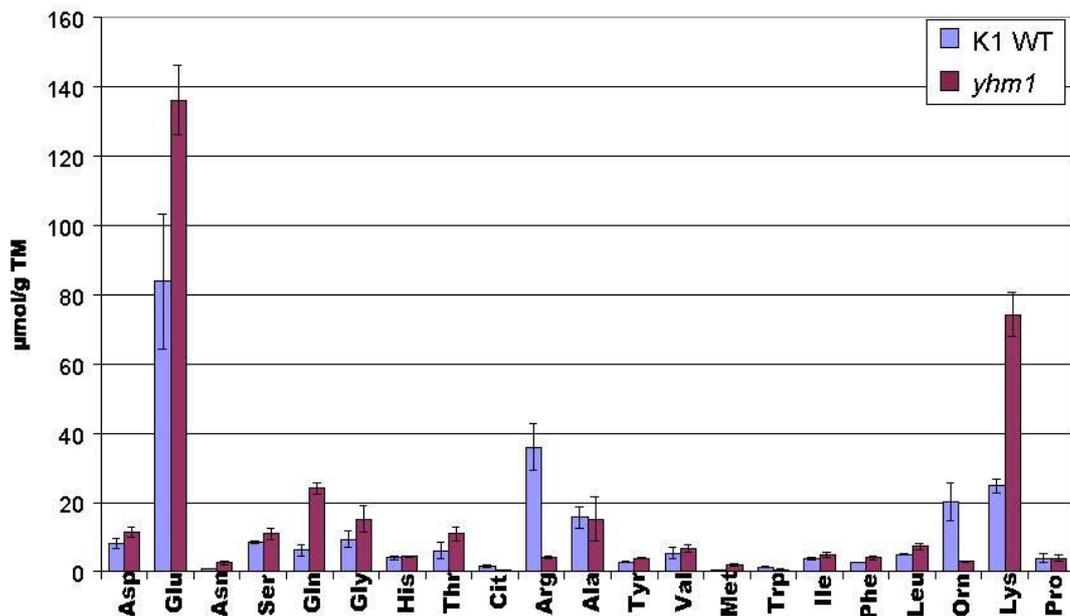


Abbildung 27: Organellärer Aminosäuregehalt von in MAD-Medium gewachsenen *S. cerevisiae* K1 WT- und *yhm1*-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase.

### 5.2.10.2 Zellextrakte von K1 WT-, *yhm1*-, *ort1*- und *yhm1/ort1*-Hefezellen

Nach Vorkultur in YPD-Medium wurden K1 WT-, *yhm1*-, *ort1*- und *yhm1/ort1*-Hefezellen in MAD-Medium kultiviert und in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Mit der Glasmühle wurden Gesamtextrakte hergestellt, die mit HPLC auf ihre Aminosäurezusammensetzung untersucht wurden. Abbildung 28 zeigt die Daten

## Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie

als klassisches Balkendiagramm und in logarithmischer Auftragung, um Unterschiede bei den niedrig konzentrierten Aminosäuren besser sehen zu können.

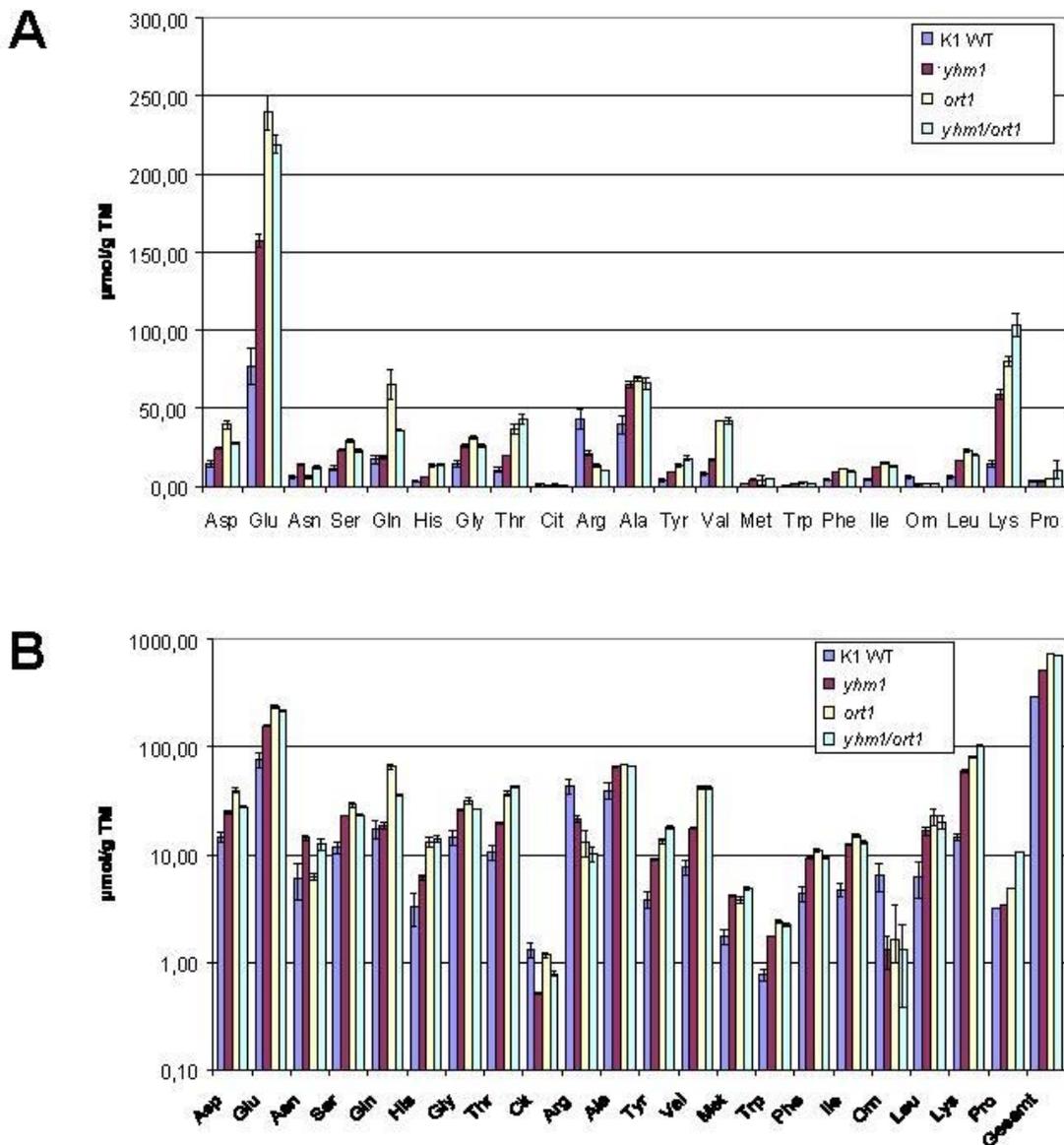


Abbildung 28: Gesamtaminosäuregehalt von in MAD-Medium gewachsenen Hefezellen in der logarithmischen Wachstumsphase. A: lineare Skalierung der Ordinate, B: logarithmische Skalierung der Ordinate.

Insgesamt waren die Aminosäurekonzentrationen in den Mutanten höher als im WT: WT-Zellen enthielten 0,29 mmol Aminosäuren/mg Trockenmasse (TM), *yhm1*-Zellen 0,51 mmol Aminosäuren/g TM, *ort1*-Zellen 0,74 mmol Aminosäuren/g TM und *yhm1/ort1*-Zellen enthielten 0,70 mmol Aminosäuren/g TM. Bei *yhm1*-Zellen war der Gehalt an allen Aminosäuren bis auf Arginin, Ornithin, Citrullin, und Glutamin und Prolin, erhöht. In *ort1*-Zellen waren alle Aminosäuren bis auf Arginin, Ornithin, Citrullin, und Asparagin in erhöhten Konzentrationen vorhanden. In der Doppelmutante waren alle Aminosäurekonzentrationen erhöht, wieder außer Arginin, Ornithin und Citrullin. Der Arginingehalt nahm in der Reihenfolge WT, *yhm1*, *ort1*, *yhm1/ort1* ab, in der gleichen Reihenfolge stieg der Lysingehalt. Der Ornithingehalt

war bei allen drei Mutanten etwa gleich stark erniedrigt, der Citrullingehalt war nur bei *yhm1*-Zellen erniedrigt. Für die meisten Aminosäuren, deren Gehalt stieg, war das Ausmaß des Anstiegs bei allen drei Mutanten gleich. Der Threonin- und Valin-gehalt war bei *yhm1*-Zellen nicht so stark angestiegen wie bei den anderen beiden Mutanten. In *yhm1*-Zellen war die Konzentration von Citrullin, Arginin und Ornithin erniedrigt, in *ort1*-Zellen waren die Konzentrationen von Arginin und Ornithin etwa gleich stark erniedrigt. In *yhm1/ort1*-Zellen war die Erniedrigung der Konzentration der drei Aminosäuren nicht wesentlich stärker als bei den Einzeldelationen.

### 5.2.11 Aufnahmemessungen an isolierten Mitochondrien

Wegen der postulierten Funktion von Yhm1p als Glutamat- oder Ornithin-Transporter, und speziell wegen der Ähnlichkeit des Phänotyps der *yhm1*-Zellen mit dem von *ort1*-Zellen, sollte die Aufnahme von radioaktiv markiertem Glutamat, Arginin und Ornithin in isolierte Mitochondrien aus WT- und *yhm1/ort1*-Zellen verfolgt werden. Die Mitochondrien wurden grundsätzlich aus Hefezellen isoliert, die in Succinat-gespuffertem YNB(-AA)-Medium mit Ammonium als N-Quelle und Ethanol als C-Quelle (MAE-Medium) mit 1 g/l Argininhydrochlorid bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,4-1,6 kultiviert worden waren. Die Ausbeute war bei Zellen aus diesem Medium mit 2-3 mg Protein / g Zellpellet deutlich höher als bei Zellen aus YPG-Medium (ca. 1 mg Protein / g Zellpellet).

#### 5.2.11.1 Glutamataufnahme

Zur Messung der Glutamataufnahme isolierter Hefemitochondrien wurden verschiedene Ansätze gewählt, die von der von der Arbeitsgruppe von Kathryn LaNoue publizierten Methode für Mitochondrien aus Rattenniere (Schoolwerth *et al.* 1983) ausgingen. Es wurden Mitochondrien mit gehemmter und ungehemmter Atmung verwendet, die Mitochondrien wurden mit Succinat oder TMPD/Ascorbat energetisiert, und der pH-Wert des Transportpuffers wurde variiert. Nur eine Erhöhung des pH-Wertes auf 8,0 führte bei mit TMPD/Ascorbat energetisierten Mitochondrien zu einer messbaren, wenn auch schwachen, Aufnahmeaktivität von 0,07 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup>. Unterschiede in der Glutamataufnahme von WT- und *yhm1/ort1*-Mitochondrien waren nicht messbar.

#### 5.2.11.2 Aufnahme von Arginin und Ornithin

Für diese Versuche wurde nach Soetens *et al.* (1998) die mitochondriale Atmung mit Antimycin A und Oligomycin gehemmt, Transaminasen wurden mit Aminoxyacetat gehemmt. Abweichend wurden die Mitochondrien nicht aus Zellen isoliert, die mit Galactose als C-Quelle gewachsen waren (MAE-Medium), da die Präparation von Mitochondrien aus diesen Zellen nicht zufriedenstellend gelang, sondern aus Zellen, die mit Ethanol als C-Quelle gewachsen waren. Wie in Soetens *et al.* (1998) wurde das Minimalmedium mit 1 g/l Argininhydrochlorid ergänzt.

Es konnte Argininaufnahme mit Aktivitäten von 1,9 bis 2,6 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> und Ornithinaufnahme von 0,4 bis 0,8 nmol min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> gemessen werden. Als Beispiel sind die Messwerte eines Messtages in Abbildung 29 gezeigt. Es ist kein spezifischer Hemmstoff des mitochondrialen Arginintransports beschrieben, mit dem die Annahme, dass es sich bei der gezeigten Reaktion um durch ein Transportprotein katalysierten Transport handelt, bestätigt werden könnte. Ein Hinweis auf

proteinkatalysierten Transport ist die Temperaturabhängigkeit der Reaktion: bei 10 °C war die Aufnahmeaktivität niedriger, bei 4 °C fand fast keine Aufnahme statt.

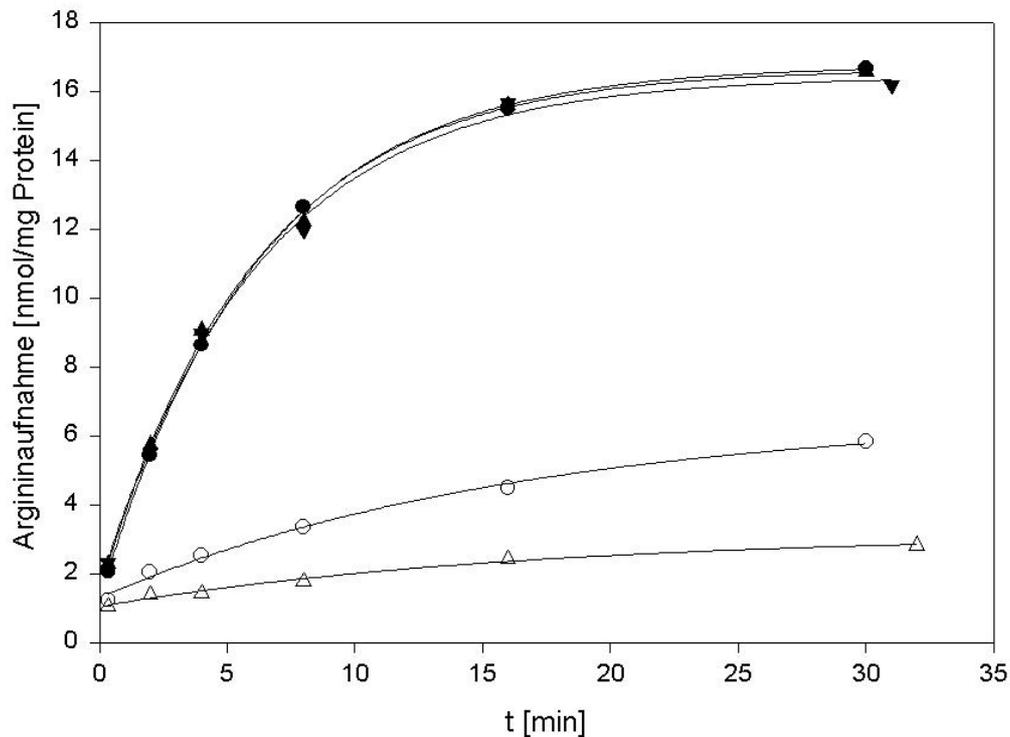


Abbildung 29: Argininaufnahmemessung in Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 WT, gewachsen in MAE-Medium inkl. 1 g/l L-Argininhydrochlorid. Die Mitochondrienmenge betrug 2 mg Protein/ml, die Argininkonzentration betrug 100  $\mu$ M. Die geschlossenen Symbole zeigen drei hintereinander durchgeführte Messreihen bei 30 °C, die offenen Kreise zeigen eine Messreihe bei 10 °C, die offenen Dreiecke eine Messung auf Eis.

Tabelle 31: Anfängliche Aufnahmearten von Arginin und Ornithin in Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1/ort1*, gewachsen in MAE + 1 g Arg/l.  $c(\text{Arg})$  bzw.  $c(\text{Orn}) = 100 \mu\text{M}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Angegeben sind die Mittelwerte von je drei Messreihen  $\pm$  SD.

Stamm	nmol Arginin $\text{min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$	nmol Ornithin $\text{min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$
K1 WT	2,23 $\pm$ 0,08	0,59 $\pm$ 0,01
K1 WT	2,46 $\pm$ 0,06	0,64 $\pm$ 0,03
<i>yhm1/ort1</i>	2,1 $\pm$ 0,3	0,50 $\pm$ 0,05
<i>yhm1/ort1</i>	2,6 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,1

Mit dieser Methode wurde die Aufnahmeaktivität isolierter Mitochondrien aus K1 WT- und *yhm1/ort1*-Zellen verglichen (Tabelle 31). Es konnte kein Unterschied in der Aufnahmeaktivität festgestellt werden. Lediglich die insgesamt akkumulierte Menge an Substrat lag bei den *yhm1/ort1*-Zellen etwas niedriger, für Arginin bei 75-90%, für Ornithin bei 60-90% des WT (Tabelle 32).

## Transportfunktionen von Mitgliedern der mitochondrialen Carrierfamilie

Tabelle 32: Maximale Akkumulation von Arginin und Ornithin in Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1/ort1*, gewachsen in MAE + 1g/l Argininhydrochlorid.  $c(\text{Arg})$  bzw.  $c(\text{Orn}) = 100 \mu\text{M}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Angegeben sind die Mittelwerte von je drei Messreihen  $\pm$  SD.

Stamm	nmol Arginin (mg Protein) <sup>-1</sup>	nmol Ornithin (mg Protein) <sup>-1</sup>
K1 WT	14,4 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,5
K1 WT	15,2 $\pm$ 0,4	5,7 $\pm$ 0,2
<i>yhm1/ort1</i>	11,8 $\pm$ 0,1	4,4 $\pm$ 0,2
<i>yhm1/ort1</i>	13,2 $\pm$ 0,5	4,8 $\pm$ 0,1

In den von mir untersuchten Zellen fehlte neben *yhm1* auch der schon bekannte Arginin/Ornithincarrier Ort1p. Trotzdem zeigten die Mitochondrien aus diesen Zellen fast identische Aufnahmeaktivität von Arginin und Ornithin. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Funktion von Yhm1p als wichtiger Arginin/Ornithin-Carrier.

### 5.2.12 Bestimmung des Magnesiumgehaltes von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1*

Hinweise auf andere mögliche Funktionen von Yhm1p kamen aus genetischen Daten. *YHM1* wird in der G2-Phase des Zellzyklus induziert (Cho *et al.* 1998b) und unterdrückt bei Überexpression die Effekte, die durch Deletion von *ABF2*, eines Mitglieds der *high mobility group* (HMG) -Proteinfamilie, entstehen (Kao *et al.* 1996). Der Genname *YHM1* steht für *Yeast HMG suppressor*. Abf2p ist ein mitochondriales DNA-bindendes Protein, das für die Übertragung, Rekombination und Erhaltung des mitochondrialen Genoms notwendig ist (vgl. Einleitung). *abf2*-Mutanten wachsen langsamer auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen und verlieren ihre mtDNA bei Wachstum auf Glucose (Diffley & Stillman 1991). *abf2*-Mutanten, die *YHM1* überexprimieren, behalten ihre mtDNA jedoch auch bei Wachstum auf Glucose.

Im Stammbaum der MCF (El Moulaj *et al.* 1997) liegen auf dem gleichen Hauptast wie *YHM1* unter anderem die putativen Mg-Carrier Mrs3p und Mrs4p (Gregan *et al.* 2001b) und der Phosphatcarrier Mir1p und seine Isoform (ORF YER053c). Zusammen mit dem DNA-verbundenen Effekt von *YHM1* als *abf2*-Suppressor führte die Lage im Stammbaum zu der Idee, dass Yhm1p ein Magnesiumcarrier sein könnte. Magnesium ist wichtig für die Nukleinsäurestabilität (zur Übersicht Saris *et al.* 2000), und eine erniedrigte  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration in den Mitochondrien führt zu *splicing*-Defekten der mitochondrialen DNA (Gregan *et al.* 2001b). Außerdem spielt  $\text{Mg}^{2+}$  eine Rolle bei vielen enzymatischen Reaktionen, u.a. als Kofaktor der N-Acetylglutamatkinase Arg5,6p, eines mitochondrialen Enzyms der Argininsynthese. Mg-Mangel in den Mitochondrien aufgrund eines Fehlens von Yhm1p könnte also zu einer Störung der Argininsynthese führen, eine erhöhte  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration durch Überexpression von *YHM1* könnte die Stabilität der mitochondrialen DNA beeinflussen und so das Fehlen von Abf2p ausgleichen. Da die Deletion der schon bekannten mitochondrialen Mg-Carrier-Gene *MRS2* oder *LPE10* zu einer erniedrigten Mg-Konzentration in den Mitochondrien führt (Bui *et al.* 1999, Gregan *et al.* 2001a), sollte die Mg-Konzentration in WT- und *yhm1*-Mitochondrien verglichen werden.

5.2.12.1 Mg-Bestimmung mit Massenspektrometrie

Die Mitochondrien wurden aus K1 WT- bzw. *yhm1*-Hefezellen isoliert, die in MAE-Medium mit 1 g/l Argininhydrochlorid gewachsen waren. Aus diesen Mitochondrien wurde durch Ultraschallbehandlung ein wässriger Extrakt hergestellt (nach Gregan *et al.* 2001b). Ein Teil der Mitochondrienpräparation wurde in Anwesenheit von 0,1 mg/ml Digitonin beschallt (nach Gregan *et al.* 2001a). Die Extrakte wurden vom Zentrallabor des Forschungszentrums Jülich mit Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelter Plasmaionisation (ICP-MS) auf den Gehalt an Mg, Ca und Fe untersucht (Tabelle 33).

Tabelle 33: Gehalt von Mg, Ca und Fe in Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1*. Die zur Analyse verwendeten Extrakte wurden entweder mit oder ohne Digitonin hergestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte von Mehrfachbestimmungen aus je einer Probe, ± SD.

	ohne Digitonin		0,1 mg/ml Digitonin	
	K1 WT	<i>yhm1</i>	K1 WT	<i>yhm1</i>
Mg [nmol/mg Protein]	146±3	105±3	150±3	103±3
Ca [nmol/mg Protein]	8±1	7±1	16±2	19±3
Fe [nmol/mg Protein]	4,9±0,1	4,9±0,2	6,0±0,1	5,4±0,5

Die *yhm1*-Mitochondrien enthielten nur etwa 70% des Magnesiums der WT-Mitochondrien. Calcium- und Eisengehalt dagegen unterschieden sich nicht signifikant zwischen WT und *yhm1*-Mitochondrien.

Die Magnesium-Bestimmung lieferte bei beiden Extraktionsmethoden die gleichen Ergebnisse. Calcium dagegen scheint bei einer Extraktion mit Digitonin noch mehr aus den Mitochondrien freigesetzt zu werden, die mit Digitonin erreichten Werte waren mehr als doppelt so hoch wie die der Extraktion ohne Digitonin. Auch Eisen wurde mit Digitonin etwas mehr freigesetzt.

5.2.12.2 Mg-Bestimmung mit Atomabsorptionsspektrometrie

Da die in 5.2.12.1 beschriebenen Ergebnisse nur mit je einer Probe aus je einer WT- bzw. *yhm1*-Mitochondrienpräparation erhalten worden waren, sollte ein größer angelegter Versuch sie statistisch absichern. Zusätzlich sollte der Mg-Gehalt von Mitochondrien aus Zellen, die in Mg-armem Medium gewachsen waren, bestimmt werden. In einem Vorversuch wurde das Wachstum von WT-Zellen in Minimalmedium mit Ethanol als C-Quelle, Ammonium als N-Quelle und verschiedenen Konzentrationen von Mg<sup>2+</sup> beobachtet. Die Wachstumsgeschwindigkeit änderte sich nicht bei Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 4-0,1 mM, mit 60 µM Mg<sup>2+</sup> im Medium wuchsen die Zellen etwas langsamer, mit 40 µM Mg<sup>2+</sup> deutlich langsamer. Die Konzentration von 60 µM Mg<sup>2+</sup> wurde ausgewählt für das Mg-arme Medium, da mit dieser Konzentration die Zellen offensichtlich schon Magnesium-limitiert waren, jedoch noch nicht stark geschädigt.

*S. cerevisiae* K1 WT und K1 *yhm1* wurden in CBS2E-Medium (mit der üblichen Mg<sup>2+</sup>-Konz. von 2 mM) und CBS2E<sub>60</sub>-Medium (60 µM Mg<sup>2+</sup>) kultiviert. Aus den Zellen wurden die Mitochondrien isoliert und aus den Mitochondriensuspensionen klare Extrakte hergestellt. Diese wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer am Geografischen Institut der Universität Köln von Dr. Manfred Thönnessen auf Mg-Gehalt untersucht (Tabelle 34). Insgesamt waren die Werte niedriger als die mit

ICP-MS gefundenen Werte, es gab große Schwankungen sowohl bei Untersuchung mehrerer Extrakte aus der gleichen Präparation als auch zwischen verschiedenen Mitochondrienpräparationen, was sich in den hohen Standardabweichungen niederschlägt.

Tabelle 34: Mg-Gehalt in Mitochondrien aus *S. cerevisiae* K1 WT und *yhm1*. Die zur Analyse verwendeten Extrakte wurden ohne Digitonin hergestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte von Mehrfachbestimmungen aus je drei unabhängigen Präparationen,  $\pm$  SD.

Mg-Konz. im Medium	2 mM Mg <sup>2+</sup>		60 $\mu$ M Mg <sup>2+</sup>	
Stamm	K1 WT	<i>yhm1</i>	K1 WT	<i>yhm1</i>
Mg [nmol/mg Protein]	78 $\pm$ 5	87 $\pm$ 15	90 $\pm$ 20	91 $\pm$ 6

Es wurde kein Unterschied festgestellt zwischen Mitochondrien aus WT- und *yhm1*-Zellen, außerdem war der mitochondriale Mg-Gehalt von Zellen, die in Mg-armem Medium gewachsen waren, so hoch wie der von Mitochondrien aus Zellen, die in Mg-reichem Medium gewachsen waren.

## 5.3 Diskussion

### 5.3.1 Ist der mitochondriale Pyruvattransporter ein MCF-Mitglied?

Nachdem sich die Vermutung, dass Mch3p ein mitochondrialer Pyruvattransporter sei, nicht bestätigt hatte, wurde der Pyruvatcarrier wieder in der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) gesucht. Zu Beginn dieser Arbeit war die Funktion von 23 der 35 MCF-Mitglieder aus Bäckerhefe nicht bekannt. Da der mitochondriale Pyruvatcarrier noch nicht gefunden worden war, obwohl die Gene sämtlicher MCF-Mitglieder in anderen Arbeitsgruppen schon deletiert worden waren, bestand die Vermutung, dass der Pyruvatcarrier entweder kein Mitglied der MCF sei, oder dass mehr als ein MCF-Mitglied Pyruvattransport katalysieren konnte. Bäckerhefe ist in ihrer Proteinausstattung in hohem Maße redundant, der Ansatz, durch Deletion eines Gens dessen Funktion am Phänotyp der Deletionsmutante zu erkennen, führt deshalb oft nicht zum gewünschten Erfolg. So kann die Aufnahme von Glucose über die Plasmamembran von 20 verschiedenen Proteinen katalysiert werden (Wieczorke *et al.* 1999). Drei MCF-Mitglieder können den Austausch von ADP und ATP über die innere Mitochondrienmembran katalysieren, Aac1p, Aac2p und Aac3p. Aac2p ist das häufigste Protein in der inneren Mitochondrienmembran, die beiden anderen Proteine sind kaum detektierbar (Knirsch *et al.* 1989). Entsprechend führt eine Deletion von AAC2 zu einem *petite* Phänotyp, Deletion der anderen beiden AAC-Gene nicht (Gawaz *et al.* 1990). Eine Überexpression von AAC1 oder AAC3 kann das Fehlen von AAC2 jedoch ausgleichen (Kolarov *et al.* 1990). Die drei Gene werden unterschiedlich reguliert, AAC2 und AAC3 werden durch Glucose reprimiert, AAC3 wird durch Sauerstoff, AAC1 durch Sauerstoffmangel reprimiert (Gavurnikova *et al.* 1996). Mitochondrien aus Zellen, die je nur einen der drei AACs exprimieren, zeigen gleiche Transportaktivitäten für ATP und ADP, unabhängig davon, ob AAC1, AAC2 oder AAC3 exprimiert wird (Drgon *et al.* 1992). Ohne die Kenntnis aller drei Adeninnukleotidcarrier wäre der Nachweis, dass für anaerobes Wachstum mindestens eins der Gene funktionell sein muss, nicht möglich gewesen (Drgon *et al.* 1991). Diese Beispiele zeigen, dass es bei Bäckerhefe oft notwendig ist, mehrere Gene zu deletieren, um einen vom WT abweichenden Phänotyp zu erhalten. Die drei Adeninnukleotidcarrier bilden im phylogenetischen Stammbaum der MCF eine

eigene Gruppe, das erleichterte die Suche nach MCF-Mitgliedern mit einer homologen Funktion. Da vermutet wurde, dass mehrere Proteine den Pyruvattransport katalysieren konnten, wurde analog zu den Aac-Proteinen nach einer Gruppe von untereinander sehr ähnlichen MCF-Mitgliedern gesucht. 4 Paare wurden im MCF-Stammbaum (Nelson *et al.* 1998) gefunden: *MRS3/MRS4* (75% identisch), *YEL006w/YIL006w* (58% identisch), *YMC1/YMC2* (69% identisch), *YOR222w/YPL134c* (60% identisch). Im Durchschnitt sind die Mitglieder der MCF zu etwa 30% miteinander identisch, die AAC-Proteine untereinander zu etwa 80%. Da für den Pyruvatcarrier eine hohe Expression erwartet wurde, wurde das ORF-Paar *YOR222w/YPL134c* zur Deletion ausgewählt. Die *cai*-Werte als Hinweis auf hohe Expression waren bei diesem Genpaar am höchsten. Das zweite Genpaar, das deletiert wurde, war untereinander nicht besonders ähnlich. *YHM1* wurde aufgrund seines hohen *cai*-Wertes ausgewählt, *YER053c* aufgrund des dem von *pda1*-Zellen ähnelnden Phänotyps einer Deletionsmutante dieses ORFs in glucoselimitierter kontinuierlicher Kultur (Eckhard Boles, pers. Information). Untersuchungen zur Pyruvatveratmung von isolierten Mitochondrien aus WT-Zellen und Zellen, bei denen eins oder beide der ORF-Paare deletiert waren, zeigten keine Unterschiede. Der Pyruvatcarrier war also auch in den Mitochondrien aus den Deletionsmutanten noch aktiv. Weitere Kandidaten für die Funktion als Pyruvatcarrier in der MCF sind gemäß den obigen Überlegungen die beiden Paare *YMC1/YMC2* und *YEL006w/YIL006w*, da die Funktionen von *MRS3/MRS4* und *YOR222w/YPL134c* inzwischen bekannt sind (s.u.).

### 5.3.2 Was ist die Funktion von Yhm1p?

Parallel zu den Atmungsversuchen durchgeführte Wachstumsexperimente zeigten einen deutlichen Wachstumsnachteil von Zellen, bei denen das ORF-Paar *YER053c/YDL198c* deletiert worden war. Dieses Phänomen wurde weiter untersucht. Die Funktion der von dem ORF-Paar *YOR222w/YPL134c* codierten Proteine wurde nach Beginn dieser Arbeit veröffentlicht: rekonstituiert in Liposomen katalysieren sie den Transport von 2-Oxodicarboxylaten (Palmieri *et al.* 2001). Die beiden Proteine, die *Odc1p* und *Odc2p* genannt wurden, spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der cytoplasmatischen Biosynthese von Lysin und Glutamat, indem sie das dafür benötigte 2-Oxoadipat aus der mitochondrialen Matrix ins Cytosol transportieren.

Der Wachstumsnachteil von Zellen, denen die beiden ORFs *YER053c* und *YDL198c* fehlten, auf nicht fermentierbaren C-Quellen wurde auf das Fehlen des ORFs *YDL198c* zurückgeführt, da der Phänotyp von *yhm1*-Zellen (denen nur *YDL198c* fehlte), identisch mit dem von *ERDL*-Zellen war (denen beide ORFs fehlten). In Minimalmedium war dieser Wachstumsnachteil deutlich stärker: Auch auf der fermentierbaren C-Quelle Glucose wuchsen die *yhm1*-Zellen deutlich langsamer als WT-Zellen. Die Ergänzung des Minimalmediums mit Arginin erhöhte die Wachstumsgeschwindigkeit von *yhm1*-Zellen auf Glucose fast auf die von WT-Zellen. Damit war eine Arginin-Bradytrophie als Phänotyp der *yhm1*-Zellen gezeigt. Mit nicht fermentierbaren C-Quellen bzw. mit Prolin oder Glutamat als einziger Stickstoffquelle konnte Argininzugabe das Wachstum der *yhm1*-Zellen zwar beschleunigen, die Wachstumsgeschwindigkeit blieb aber immer deutlich unter der von Wildtyp-Zellen.

### 5.3.3 Warum konnte Argininzugabe bei Wachstum mit Ethanol oder Prolin das Fehlen von Yhm1p nicht ausgleichen?

Die fehlende oder schwächere positive Wirkung von Argininzugabe bei Wachstum auf Prolin bzw. Glutamat und/oder Ethanol lassen sich durch verschiedene Hypothesen erklären:

- 1 Arginin wird unter den gewählten Wachstumsbedingungen nicht aufgenommen.
- 2 Die Zellen brauchen unter den gewählten Wachstumsbedingungen außer Arginin noch weitere Stoffe.
- 3 Zellfunktionen sind gestört, die bei Wachstum auf Glucose/Ammonium unnötig sind.

Zu 1: Bäckerhefe reguliert ihren Stickstoffhaushalt abhängig vom vorhandenen Stickstoffangebot. Bei Vorhandensein einer bevorzugten Stickstoffquelle werden Aufnahmesysteme und katabole Enzyme für andere Stickstoffquellen reprimiert, ein Mechanismus, der als *nitrogen catabolite repression* (NCR) bekannt ist (zur Übersicht Hofman-Bang 1999). Die bevorzugten Stickstoffquellen sind, in der Reihenfolge der Bevorzugung/Stärke der NCR: Asparagin/Glutamin > Ammonium > Glutamat > Harnstoff > GABA > Prolin. Bei Wachstum auf Prolin werden die Aminosäureaufnahmesysteme nicht reprimiert, die Argininaufnahme über die Plasmamembran durch den allgemeinen Aminosäuretransporter Gap1p und die für basische Aminosäuren spezifischen Transporter Can1p und Alp1p (Regenberg *et al.* 1999) sollte also sichergestellt sein. Selbst mit Ammonium als Stickstoffquelle, d.h. bei starker Repression aller Aminosäuretransporter, konnte Arginin im Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle den *yhm1*-Wachstumsdefekt ausgleichen. Beides spricht gegen eine gestörte Aufnahme des Arginins in die Zelle bei Wachstum mit Prolin als N-Quelle.

Es gibt nur wenig Daten zur Regulation der Aminosäureaufnahmesysteme in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle. Die Regulation von Stickstoff- und Kohlenstoffmetabolismus in Hefe ist jedenfalls miteinander vernetzt, z.B. über den HAP-Komplex, einen Transkriptionsfaktor, der sowohl die Transkription des für die Ammonium-assimilierende Glutamat-Dehydrogenase codierenden *GDH1*-Gens stimuliert (Dang *et al.* 1996), als auch die Transkription von Genen, die bei Atmung und Mitochondrien-Biogenese eine Rolle spielen (de Winde & Grivell 1993). Die Transkription der Aminosäuretransporter-Gene *GAP1*, *CAN1* und *ALP1* ändert sich nicht während des diauxischen *shifts*, also des Übergangs von Glucose-Fermentation zu Ethanolveratmung (de Risi *et al.* 1997). Grundsätzlich ist eine Hemmung der Funktion der Arginin-Aufnahmeproteine Can1p und Alp1p bei Wachstum auf Ethanol vorstellbar, da die Zellen aber, wenn zusätzlich zu Ethanol als C-Quelle Prolin statt Ammonium als N-Quelle angeboten wurde, noch langsamer wuchsen, die Expression der Aminosäurecarrier mit Prolin als N-Quelle aber stimuliert wird, scheint nicht die fehlende Aufnahme dafür verantwortlich zu sein, dass Arginin nicht Wachstum mit WT-Geschwindigkeit ermöglicht.

Zu 2: Falls die Zellen noch andere Stoffe brauchen, sind diese auch in Vollmedium nicht vorhanden, da auch in Vollmedium die ERDL-Zellen (*yhm1 yer023c*) mit Glyce-

rin oder Ethanol als Kohlenstoffquelle deutlich langsamer als der Wildtyp wuchsen. Da die geforderten Stoffe nicht in Vollmedium vorhanden sind, wird eine Suche nach ihnen sehr schwierig, solange man keine Anhaltspunkte hat.

Zu 3: Bei Wachstum auf Glucose sind Bestandteile der Atmungskette, des Citratzyklus und mitochondriale Transportproteine reprimiert, ein Phänomen, das man Glucoserepression oder Katabolitrepression nennt (zur Übersicht Dickinson 1999). Da bei Wachstum auf Glucose die Glucose zu Ethanol abgebaut wird, ist die Atmungskette unnötig. Bei Wachstum auf Ethanol ist die Atmungskette dagegen unabdingbar. Zellen mit Defekten in der Atmungskette können auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol nicht oder nur langsam wachsen (zur Übersicht Chen & Clark-Walker 1999).

Auch zur Verwertung von Prolin als Stickstoffquelle ist die Atmungskette erforderlich, da der Prolinabbau zu Glutamat in den Mitochondrien stattfindet (zur Übersicht Cooper 1982 und Abbildung 30) und die mitochondriale Prolinoxidase (Prolindehydrogenase) Put1p für ihre Aktivität eine funktionelle Elektronentransportkette braucht (Wang und Brandriss 1986).

Eine nicht normal funktionierende Atmungskette könnte also die Wachstumsdefekte der *yhm1*-Zellen mit Ethanol als Kohlenstoffquelle oder Prolin als Stickstoffquelle erklären. Argininmangel wäre dann nicht das einzige Problem der Zellen, Argininzugabe könnte deswegen das Wachstum der Zellen nicht auf Wildtypniveau bringen.

Für das Auftreten einer nicht normal funktionierenden Atmungskette sind verschiedene Ursachen vorstellbar:

a) Die Zellen sind  $\rho^-$  oder  $\rho^0$ , d.h. große Bereiche ihrer mitochondrialen DNA sind deletiert, oder sie besitzen überhaupt keine mitochondriale DNA mehr. In beiden Fällen fehlen der Atmungskette die mitochondrial codierten Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom c-Oxidase, Cytochrom b, und die Untereinheiten 6, 8 und 9 des  $F_0$ -Teils der ATP-Synthase. Außerdem fehlen für die mitochondriale Proteinsynthese wichtige, z.B. ribosomale, Proteine (zur Übersicht Chen & Clark-Walker 1999). Ein Verlust der mitochondrialen DNA kann allerdings erst während der standardmäßig vor den Experimenten durchgeführten Vorkultur in fermentierbarem Medium auftreten, da die Zellen auf YPG-Platten gelagert wurden, und Zellen ohne mitochondriale DNA dort nicht überlebt hätten.

b) Die mitochondriale Proteinsynthese ist aus einem anderen Grund gestört, z.B. weil nicht genügend Aminosäuren in den Mitochondrien zur Verfügung stehen. Ein die mitochondriale Proteinbiosynthese nicht ausreichend unterstützendes Aminosäureangebot in den Mitochondrien könnte durch einen fehlenden mitochondrialen Aminosäurecarrier erklärt werden. Durch das niedrigere Angebot an Aminosäuren in den Mitochondrien wäre die Synthese der mitochondrialen Komponenten der Atmungskette behindert, das könnte der Grund für die langsamere Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen sein. Dass die Aktivität der Atmungskette von Mitochondrien ohne *Yhm1p* nicht schwächer ist (vgl. Abbildung 17) spricht nicht gegen diese Hypothese. Es sind Regelmechanismen vorstellbar, die Zellwachstum und mitochondriale Atmung miteinander verbinden, und so dafür sorgen, dass die Mitochondrien eine normale Atmungskapazität besitzen. Die *retrograde regulation* ist ein Beispiel für so einen Regelmechanismus (Liu & Butow 1999). Fehlende oder gehemmte Funktion der Mitochondrien führt zu stark erhöhter Expression einiger Gene, darunter die Gene für die ersten drei Schritte des Citratzyklus (*CIT1*, *ACO1*, *IDH1* und *IDH2*), die zur Synthese von  $\alpha$ -Ketoglutarat führen. So bleibt die Versorgung der Zelle mit diesem für die Aminosäuresynthese wichtigen Baustein erhalten.

Eine weitere Möglichkeit einer bei Wachstum auf Glucose unnötigen Funktion ist ein Redox-Shuttle. Während des Wachstums auf Ethanol wären Redox-Shuttle-Systeme sinnvoll, um die im Cytosol entstandenen Redoxäquivalente in die Mitochondrien zu transportieren, wo sie oxidiert werden können (zur Übersicht Bakker *et al.* 2001). Da *S. cerevisiae* auch externe NADH-Dehydrogenasen an der Außenseite der inneren Mitochondrienmembran besitzt (Nde1p und Nde2p, Luttk *et al.* 1998), sind diese Shuttle-Systeme nicht essentiell, wenn sie aber ausgeschaltet werden, ist ein Wachstumsdefekt beschrieben (zitiert in Bakker *et al.* 2001). Ein Shuttle-System, das im Fall der *yhm1*-Deletion gestört sein könnte, ist der Glutamat-Malat-Shuttle. Er besteht bei Säugern aus dem Glutamat/Aspartat-Carrier, dem  $\alpha$ -Ketoglutarat/Malat-Carrier, und je einer Transaminase und Malatdehydrogenase im Cytosol und im Mitochondrium. Bei *S. cerevisiae* ist die Existenz des Shuttles umstritten. Die Gene für die Enzyme sind in der Hefe alle vorhanden, die beiden Carrierfunktionen sind in Hefe bisher nicht nachgewiesen worden. Wenn Glutamat über den Glutamat/Aspartat-Carrier in die Mitochondrien gelangt und der Glutamat/Aspartat-Carrier bei Wachstum auf Ethanol eine Rolle im Energiestoffwechsel spielt, würde eine Aktivität von Yhm1p als Glutamat/Aspartat-Carrier den nicht durch Arginin aufhebbarer Wachstumsdefekt der *yhm1*-Zellen bei Wachstum auf Ethanol erklären. Dass auch bei Prolin als Stickstoffquelle Arginin kein WT-Wachstum wiederherstellen kann, lässt sich eventuell damit erklären, dass beim Abbau von Prolin die Redox-Balance zwischen Cytosol und Mitochondrium ebenfalls verändert ist gegenüber Wachstum auf Ammonium/Glucose-Medium, so dass auch hier ein Shuttle-System nötig ist.

### 5.3.4 Warum kann Argininzugabe bei Wachstum mit Glucose und Ammonium das Fehlen von Yhm1p ausgleichen?

Die Arginin-Bradytrophie der *yhm1*-Zellen deutet auf einen Defekt in der Argininsynthese hin. Ein Teil der Argininsynthese findet bei Bäckerhefe in den Mitochondrien statt (zur Übersicht siehe Cooper 1982, Davis 1986, und Abbildung 30): Glutamat wird in den Mitochondrien acetyliert und über Acetylorithin zu Ornithin umgewandelt. Das Ornithin wird im vollständig im Cytosol ablaufenden Harnstoffzyklus über Citrullin zu Arginin umgewandelt. Wenn Yhm1p als MCF-Mitglied eine Transportfunktion in der inneren Mitochondrienmembran hat, kommen als in die Argininsynthese involvierte Funktionen der Transport von Glutamat in die Mitochondrien und der Transport von Ornithin aus den Mitochondrien ins Cytosol in Frage.



drittes Ornithintransportprotein zur Verfügung stehen, da auch Zellen, denen beide Proteine fehlten, ohne Arginin langsam wachsen konnten.

Mit Ethanol als C-Quelle oder Prolin als N-Quelle konnte Argininzugabe auch das Wachstum von *ort1*-Zellen und *yhm1/ort1*-Zellen nicht auf Wildtyp-Niveau bringen. Argininzugabe ermöglichte allerdings ein deutlich schnelleres Wachstum, interessanterweise mit der gleichen Geschwindigkeit, unabhängig davon, ob *YHM1*, *ORT1* oder sogar beide Gene fehlten. Auch diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Yhm1p und Ort1p eine ähnliche Funktion haben, Ort1p scheint, wie Yhm1p, zusätzlich zum Ornithinexport aus den Mitochondrien noch eine weitere Funktion haben, die durch Argininzugabe nicht ausgeglichen werden kann (s.o.). Dass beide Transportproteine statt für den Ornithinexport für den Glutamatimport verantwortlich sind, kann ausgeschlossen werden, da in Liposomen rekonstituiertes Ort1p Ornithin, Lysin und Arginin, aber z.B. kein Glutamat und kein  $\alpha$ -Ketoglutarat transportiert (Palmieri *et al.* 1997a). Eine für beide Proteine vorstellbare zusätzliche Funktion ist aber der Transport von Arginin in die mitochondriale Matrix zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Proteinbiosynthese. Ort1p kann diesen Transport zumindest katalysieren.

Die Bestimmung des Aminosäuregehalts von WT-, *yhm1*-, *ort1*- und *yhm1/ort1*-Zellen bestätigte die Folgerungen aus den Wachstumsexperimenten: die Deletionsmutanten hatten offensichtlich einen Defekt in der Argininsynthese, der zu stark verringertem Gehalt an Arginin, Ornithin und Citrullin führte. Die Erhöhung der Konzentration fast aller anderen Aminosäuren in den Mutanten lässt sich aus dem Argininmangel dieser Zellen erklären. Die Expression vieler Enzyme in Aminosäuresynthesewegen wird als Antwort auf den Mangel an einer Aminosäure stark erhöht. Dieses Phänomen ist als *general control of amino acid biosynthesis* bekannt (zur Übersicht Hinnebusch 1988). Der Argininmangel durch gestörte Argininsynthese führte also zu einer Aktivierung der Synthese vieler anderer Aminosäuren. Vor allem Lysin akkumulierte stark in diesen Zellen, da Bäckerhefe Lysin grundsätzlich nicht abbauen kann (Bhattacharjee 1985).

Die Ergebnisse, die mit den *ort1*-Zellen gewonnen wurden, entsprechen den in der Literatur beschriebenen Veränderungen im Aminosäurepool einer *ort1*-Mutante (Delforge *et al.* 1975). Dort wurde eine Erhöhung des Glutamat- und Lysingehaltes beschrieben (Faktor 2 bzw. Faktor 6, diese Arbeit Faktor 3 bzw. Faktor 4), außerdem eine Erhöhung des Tyrosin- (Faktor 10, hier 3), Phenylalanin- (Faktor 4, hier 2) und Histidingehaltes (Faktor 2, hier 4). Arginin und Ornithin waren auch bei Delforge *et al.* stark erniedrigt (Faktor 5 bzw. Faktor 10, hier Faktor 3 bzw. Faktor 4), Citrullin wurde nicht gemessen.

Der Arginingehalt nahm in der Reihenfolge WT, *yhm1*, *ort1*, *yhm1/ort1* ab, korrelierte also mit der Wachstumsgeschwindigkeit. In der gleichen Reihenfolge stieg der Lysingehalt. Der Ornithingehalt war bei allen drei Mutanten etwa gleich stark erniedrigt, der Citrullingehalt war nur bei *yhm1*-Zellen erniedrigt, war aber insgesamt in der Nähe des Detektionslimits, so dass diese Werte unsicher sind. Für die meisten Aminosäuren, deren Gehalt stieg, war das Ausmaß des Anstiegs bei allen drei Mutanten gleich. Die einzigen Aminosäuren außer Arginin, Ornithin und Citrullin, deren Konzentration in *yhm1*-Zellen nicht anstieg, waren Glutamin und Prolin. Prolin wird aus Ornithin synthetisiert (Abbildung 30), Glutamin gehört mit Glutamat, Asparagin und Aspartat zu den schnell metabolisierten Aminosäuren, die auch während

des Zellaufschlusses durch enzymatische Reaktionen abgebaut werden (Hecker 2002). Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der Aminosäurepool-Messungen, dass sowohl Yhm1p als auch Ort1p für die Argininsynthese wichtig sind. Aussagen zur Differenzierung der Funktionen von Yhm1p und Ort1p lassen sich aus diesen Messungen nicht ableiten.

Um die Verbindung von Yhm1p und Ort1p zum Transport von Arginin und Ornithin zu untersuchen, wurde die Aufnahme dieser Stoffe in isolierte Mitochondrien gemessen. Nur bei einem Ansatz nach Soetens *et al.* (1998), bei dem der mitochondriale Stoffwechsel vollständig gehemmt war, konnte eine konzentrationsabhängige Aufnahme beider Stoffe mit einer Kinetik erster Ordnung gemessen werden. Die Anfangstransportraten betragen bei 30 °C etwa 2,4 nmol Arginin min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> und 0,6 nmol Ornithin min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup>. In der Publikation von Soetens *et al.* (1998) sind keine Werte für die Anfangsrate der Arginin- und Ornithinaufnahme von WT-Mitochondrien bei 30°C angegeben, die Werte bei 4°C liegen bei 0,2 bis 0,6 nmol Arginin min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup>, die anfängliche Ornithin-Transportrate ist etwa viermal langsamer als die Arginin-Transportrate. Aus den in der Veröffentlichung nur grafisch gezeigten "typischen Experimenten" bei 30°C wurden mit dem Computerprogramm SigmaPlot Anfangsraten von etwa 6 nmol Arginin min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> und 0,5 bis 1,5 nmol Ornithin min<sup>-1</sup> (mg Protein)<sup>-1</sup> abgeschätzt. Bei Soetens *et al.* (1998) akkumulierten die Mitochondrien bis zu 40 nmol Arginin oder 20 nmol Ornithin (mg Protein)<sup>-1</sup>, die in dieser Arbeit isolierten Mitochondrien akkumulierten bis zu 16 nmol Arginin bzw. 7 nmol Ornithin (mg Protein)<sup>-1</sup>. Sowohl Anfangsrate der Aufnahme als auch maximale Konzentration in den Mitochondrien lagen also um einen Faktor von 2-3 unter den publizierten Werten, die jedoch mit einem anderen Stamm, der zudem anders angezogen worden war, ermittelt worden waren.

In den Transportexperimenten nahmen *yhm1/ort1*-Mitochondrien Arginin und Ornithin mit der gleichen Aktivität wie WT-Mitochondrien auf. Lediglich die maximal akkumulierte Substratmenge war in den *yhm1/ort1*-Mitochondrien etwas geringer als in WT-Mitochondrien. Soetens *et al.* (1998) zeigen in ihrer Publikation zwei beispielhafte Experimente mit Mitochondrien aus *ort1*-Zellen bei 30°C, aus denen man mit SigmaPlot eine Anfangsrate von 1,8 nmol Arginin bzw. 0,6 nmol Ornithin min<sup>-1</sup> abschätzen kann, also eine etwa dreimal niedrigere Anfangsrate als bei den Wildtypzellen. Die maximale Akkumulation betrug bei diesen Experimenten etwa 14 nmol Arginin bzw. 6 nmol Ornithin (mg Protein)<sup>-1</sup>, also auch etwa ein Drittel der WT-Werte. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass ein noch unbekanntes Protein die Aufnahme von Arginin und Ornithin in die Mitochondrien katalysieren kann. Unter den Bedingungen der durchgeführten Transportexperimente ist dieses Protein für die gesamte Aufnahmeaktivität verantwortlich. Die verwendeten Messbedingungen sind allerdings weit von der physiologischen Situation entfernt. So besaßen die verwendeten Mitochondrien kein Membranpotential, das im Organismus die treibende Energie für die Transportprozesse darstellt. Substrate konnten hier also nur im homologen Austausch oder im heterologen Austausch gegen ein anderes Gegensubstrat aufgenommen werden. Die gemessene Aufnahmeaktivität war also nicht nur von der spezifischen Aktivität der Transportproteine und der externen Substratkonzentration, sondern auch von der internen Substratkonzentration abhängig. Wenn die interne Substratkonzentration der limitierende Faktor der Substrataufnahme wäre, ist die spezifische Aktivität des unbekanntes Transportproteins vielleicht ausreichend, um  $V_{max}$  zu erreichen. Die

im WT zusätzlich vorhandenen Transporter Ort1p und vielleicht Yhm1p könnten die Aufnahme­rate nicht weiter beschleunigen. Die etwas niedrigere maximal akkumulierte Substratmenge bei *yhm1/ort1*-Mitochondrien lässt sich so auch erklären: wegen des fehlenden Ort1p (und vielleicht Yhm1p) ist die Argininsynthese gehemmt, außerdem ist vielleicht der Transport von Aminosäuren in die Mitochondrien gehemmt. Deswegen ist die Konzentration an verfügbaren Gegensubstraten für die Arginin- und Ornithinaufnahme kleiner; da die Substrate 1:1 ausgetauscht werden, kann weniger des externen Substrats aufgenommen werden. Wenn diese Vermutungen stimmen, wäre die hier angewandte Methode zur Messung der Arginin- und Ornithinaufnahme ein Maß für die Konzentration von Substraten in den Mitochondrien, und hätte nur wenig Aussagekraft über die Aktivität von Transportproteinen. In Soetens *et al.* (1998) akkumulierten die Mitochondrien etwa dreimal so viel des jeweiligen Substrats. Wenn also auch die Konzentration der Gegensubstrate in den Mitochondrien zu Beginn der Messungen dreimal so hoch war, kann das die höhere Aufnahmeaktivität der WT-Mitochondrien in ihrer Publikation im Vergleich zur Aufnahmeaktivität der WT-Mitochondrien in der vorliegenden Arbeit erklären. Auch Soetens *et al.* (1998) diskutieren, dass die niedrigere Aufnahmeaktivität der *ort1*-Mitochondrien allein eine Folge einer niedrigeren Substratkonzentration in der mitochondrialen Matrix sein kann. Dafür spricht, dass die übrigen kinetischen Parameter des Transports bei *ort1*-Mitochondrien unverändert waren (gleiches Inhibitions­muster, gleiche pH-Abhängigkeit, gleicher apparenter  $K_m$ ). Der noch viel schwächere Effekt der *ort1*-Deletion auf die Aufnahme von Arginin und Ornithin in der vorliegenden Arbeit lässt sich mit dem anderen Stammhintergrund und den anderen Kulturbedingungen erklären, die insgesamt zu einer niedrigeren Substratkonzentration in den Mitochondrien führen könnten, die vom Vorhandensein von Ort1p nicht abhängig ist.

Die in dieser Arbeit mit den Aufnahmeexperimenten an isolierten Mitochondrien gewonnenen Ergebnisse schließen also nicht aus, dass Yhm1p eine ähnliche Funktion wie Ort1p hat, die Identität von Yhm1p mit dem von Soetens *et al.* vorgeschlagenen Transporter Bac1p kann jedoch ausgeschlossen werden. Eine Technik zur Messung des Transports von radioaktiv markierten Aminosäuren aus der mitochondrialen Matrix ins umgebende Medium steht nicht zur Verfügung.

### 5.3.5 Warum hatten die BY *yhm1*-und *ort1*-Zellen einen anderen Phänotyp als die entsprechenden K1 *yhm1*-und *ort1*-Zellen?

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche mit BY-Zellen sprachen nicht für eine analoge Funktion von Ort1p und Yhm1p. *ort1*-Zellen zeigten die in der Literatur beschriebene Arginin-Bradytrophie. Auch unter Bedingungen, unter denen bei den in dieser Arbeit hergestellten Zellen das Fehlen von *ORT1* durch Argininzugabe nicht völlig ausgeglichen werden konnte, konnten die BY *ort1*-Zellen mit Arginin so schnell wachsen wie WT-Zellen. Das Fehlen von *YHM1* in BY-Zellen konnte dagegen auch mit Glucose als C-Quelle und Ammonium als N-Quelle durch Argininzugabe nicht völlig ausgeglichen werden. BY *yhm1*-Zellen konnten mit Ethanol als C-Quelle nicht wachsen.

Der BY-WT-Stamm hat Mutationen, die zu vier Auxotrophien führen. Außer einer Uracil-Auxotrophie (die K1 auch hat) hat BY noch Auxotrophien für Histidin, Leucin und Methionin. Für Untersuchungen zur Rolle von Proteinen, die eine Rolle im Stickstoffmetabolismus spielen, ist dieser Stamm daher schlecht geeignet,

grundsätzlich geben die Phänotypen der K1 *yhm1*- und *ort1*-Zellen eher Auskunft über die physiologische Rolle von Yhm1p und Ort1p. Jede Auxotrophie verändert den Stoffwechsel der Zellen, durch Ausfall des entsprechenden Stoffwechselweges sowie durch die notwendige Zugabe des nicht mehr synthetisierten Stoffes im Medium. Auch die Uracil-Auxotrophie der K1-Zellen kann bei den Untersuchungen dieser Arbeit ungewollte Effekte ausgelöst haben. Ohne eine Auxotrophie sind die Zellen jedoch nur schwer genetisch zu manipulieren, die Deletion von *ORT1* in *yhm1*-Zellen wäre so nicht möglich gewesen.

Auch wenn die Ergebnisse mit den BY-Stämmen grundsätzlich weniger Informationen über die Funktionen der deletierten Gene liefern, so ist doch deutlich, dass BY *yhm1*- und *ort1*-Zellen verschiedene Phänotypen haben. Es handelt sich nicht, wie bei K1 *yhm1*- und *ort1*-Zellen vermutet, um verschiedene Abstufungen des selben Effekts, BY *ort1*-Zellen zeigen Arginin-Bradytrophie, K1 *yhm1*-Zellen nicht.

Es ist allgemein bekannt, dass unterschiedliche Hefestämme völlig unterschiedliches Verhalten unter verschiedensten Bedingungen zeigen (z.B. Cooper 1982). Da mindestens eine Hand voll verschiedene Hefestämme weltweit häufig als "Wildtyp"-Stämme verwendet werden, weisen veröffentlichte Daten zu *S. cerevisiae* Widersprüche auf. Auch aus diesem Grund schlug eine Gruppe elf verschiedener europäischer Labors aus Industrie und Universität vor, den Stamm CEN.PK als Referenzstamm zur physiologischen Forschung zu verwenden (van Dijken *et al.* 2000). Die wichtigsten Eigenschaften dieses Stammes sind hohe spezifische Wachstumsrate, eine hohe Biomasseausbeute und eine gute Transformierbarkeit. Die in dieser Arbeit verwendeten WT-Stämme K1 und K26 sind Derivate von CEN.PK. Weitere Untersuchungen zum Vergleich der Phänotypen der Deletionsmutanten auf Basis von K1 oder BY wurden aus den oben genannten Gründen nicht durchgeführt, zumal schon die WT-Stämme ein deutlich unterschiedliches Verhalten zeigten (Tabelle 29 und Tabelle 30).

### 5.3.6 Ist Yhm1p ein Magnesiumtransporter?

Die Lage von Yhm1p im Stammbaum der MCF, sowie die Tatsache, dass Yhm1p als *abf2*-Suppressor Einfluss auf die Stabilität der mtDNA zu haben scheint, führten zu der Vermutung, Yhm1p wäre ein Magnesiumtransporter. Die mit ICP-MS auf ihren Gehalt an Mg, Ca und Fe untersuchte Einzelprobe aus *yhm1*-Mitochondrien enthielt weniger Mg als die Probe aus WT-Mitochondrien. Die Literaturwerte für Bäckerhefe für Magnesium und Calcium sind 1,5 bis 2 mal so hoch, der Eisengehalt entspricht dem in dieser Messung nachgewiesenen (Bui *et al.* 1999, Gegan *et al.* 2001a, Gegan *et al.* 2001b). Diese Literaturwerte stammen alle aus der selben Arbeitsgruppe, die einen anderen Hefestamm verwendete.

Ein groß angelegter Versuch zur statistischen Absicherung der mit ICP-MS erhaltenen Ergebnisse konnte diese nicht bestätigen. Mit Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) wurde eine insgesamt niedrigere Mg-Menge in den mitochondrialen Extrakten nachgewiesen, Unterschiede zwischen Mitochondrien aus WT-Zellen und *yhm1*-Zellen konnten nicht gezeigt werden. Die Werte variierten stark zwischen separaten Mitochondrienpräparationen, aber auch zwischen separaten Extrakten der selben Mitochondrienpräparation. Die offensichtlich hohe biologische und experimentelle Variabilität hat vermutlich zu dem abweichenden Ergebnis bei der Messung je einer

Einzelprobe mit ICP-MS geführt. Die Hypothese, dass Yhm1p ein mitochondrialer Magnesiumtransporter ist, konnte nicht bestätigt werden.

### 5.3.7 Was ist die Funktion von Yhm1p?

Die Verbindung von *YHM1* zum Argininstoffwechsel von Bäckerhefe konnte in dieser Arbeit zwar auf vielfache Weise gezeigt werden, diese Verbindung einer beweisbaren Funktion zuzuordnen gelang jedoch nicht. Eine Funktion analog zur Funktion von Ort1p ist vorstellbar und mit den erhaltenen Ergebnissen vereinbar. Auch neueste Veröffentlichungen bestätigen die Verbindung von Yhm1p und Argininstoffwechsel: Qian *et al.* (2001) haben einen neuen Algorithmus zur Erkennung von gemeinsam regulierten Genen in *Microarrays* entwickelt. Auf der die Veröffentlichung begleitenden Seite im World Wide Web findet dieser Algorithmus das Gen *CPA1* als mit *YHM1* coreguliertes Gen. *CPA1* codiert für eine der zwei Untereinheiten der Carbamoylphosphat-Synthetase, eines Enzyms der Argininsynthese (vgl. Abbildung 30).

Eine Suche nach zu Yhm1p homologen Proteinen in einer Datenbank mit Sequenzen menschlicher Proteinen (public humanPSD, <http://www.incyte.com>, Hodges *et al.* 2002) im April 2002 zeigte als ähnlichstes Protein den humanen mitochondrialen Ornithintransporter SLC25A15 (Camacho *et al.* 1999).

## 6 Zusammenfassung

Die Mch-Proteinfamilie (*monocarboxylate permease homologs*) in Bäckerhefe wurde aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Mitglieder zu den MCT-Proteinen (*monocarboxylate transport proteins*) in Säugern identifiziert. Die MCT-Proteine transportieren Monocarboxylate über die Plasmamembran. MCT- und Mch-Proteine haben laut Vorhersage 10-12 Transmembran-Helices. Ein Mch3p-GFP-Fusionsprotein ist in Mitochondrien von *S. cerevisiae* lokalisiert. Die Hypothese, dass es sich bei Mch3p um den mitochondrialen Pyruvatcarrier handelt, sollte überprüft werden.

Zunächst wurde die mitochondriale Lokalisation von Mch3p durch Nachweis eines Mch3p-HA-Fusionsproteins in isolierten Mitochondrien bestätigt. Die pyruvatabhängige Atmungsaktivität isolierter intakter Mitochondrien aus Zellen, bei denen *MCH3* oder alle 5 *MCH*-Mitglieder deletiert waren, war von der von Mitochondrien aus WT-Zellen nicht zu unterscheiden. Bei Wachstum auf Glucose, Ethanol, Glycerin und Lactat verhielten sich *mch1-5*-Zellen wie WT-Zellen, Ethanolproduktion und Lactatgehalt der Zellen waren gleich. In aerober glucoselimitierter kontinuierlicher Kultur hatten *mch3*- und *mch1-5*-Zellen allerdings eine niedrigere Trockenmasseausbeute als WT-Zellen, ähnlich wie Pyruvatdehydrogenase-negative *pda1*-Zellen. Dieser Phänotyp war auch für Zellen erwartet worden, die keinen funktionalen mitochondrialen Pyruvatcarrier mehr haben, da die Zellen bei Fehlen von Pyruvatdehydrogenase oder Pyruvatcarrier einen energetisch ungünstigeren metabolischen Alternativweg einschlagen müssen, um Energie gewinnen zu können. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Pyruvataufnahmeaktivität isolierter Mitochondrien aus WT- und *mch1-5*-Zellen gezeigt werden.

Bei der anschließenden, erfolglosen, Suche nach dem mitochondrialen Pyruvatcarrier in der mitochondrialen Carrierfamilie (MCF) wurde ein Wachstumsnachteil von Zellen entdeckt, bei denen das MCF-Mitglied *YHM1* deletiert war. Der Effekt wurde genauer als Arginin-Bradytrophie charakterisiert: ohne Arginin im Medium konnten die Zellen nur langsam wachsen. Arginin-Supplementation war nur dann ausreichend, um normales Wachstum wieder herzustellen, wenn die C-Quelle des Mediums Glucose und die N-Quelle des Mediums Ammonium war. Die Deletion von *YHM1* führte zu Veränderungen der intrazellulären Aminosäurepools, die durch eine gestörte Arginin-Synthese erklärt werden können. Da der Phänotyp der *yhm1*-Zellen dem von Zellen glich, bei denen der mitochondriale Ornithin-Exporter *ORT1* mutiert war, wurde *ORT1* in WT- und *yhm1*-Zellen deletiert. Arginin-Bradytrophie und veränderter Aminosäurepool traten auch bei diesen *ort1*-Mutanten auf, die Effekte der beiden Deletionen auf das Wachstum von Hefezellen addierten sich in *yhm1/ort1*-Zellen. Die *yhm1/ort1*-Zellen konnten jedoch noch langsam ohne Arginin wachsen. Auch bei *ort1*-Zellen war der wachstumsbeschleunigende Effekt von Argininzugabe ins Medium nur bei Glucose und Ammonium als C- und N-Quelle vollständig. Zusammengefasst deuteten diese Ergebnisse auf eine ähnliche Funktion von Yhm1p und Ort1p hin, so dass vermutet wurde, es könnte sich bei Yhm1p um den von Soetens *et al.* (1998) vorgeschlagenen Transporter für basische Aminosäuren handeln, der in *ort1*-Mitochondrien aktiv ist und dem der Name "Bac1p" gegeben worden war. Mitochondrien aus *yhm1/ort1*-Zellen zeigten jedoch eine kaum veränderte Aufnahme von Arginin und Ornithin. Damit war gezeigt, dass Yhm1p nicht

der den mitochondrialen Import von basischen Aminosäuren katalysierende Transporter "Bac1p" ist. Eine ähnliche Funktion von Yhm1p und Ort1p als Proteine, die deren Hauptaufgabe der Export von Ornithin zur Argininsynthese aus der mitochondrialen Matrix ist, ist denkbar, aber schwer nachzuweisen.

## 7 Literatur

- Adrian GS, McCammon MT, Montgomery DL, Douglas MG (1986). Sequences required for delivery and localization of the ADP/ATP translocator to the inner mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 6, 626-634
- André B (1995). An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1575-1611
- Aquila H, Link TA und Klingenberg M (1987). Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family. *FEBS Letters* 212, 1-9
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons
- Averet N, Fitton V, Bunoust O, Rigoulet M, Guerin B (1998). Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol Cell Biochem* 184(1-2), 67-79
- Baganz F, Hayes A, Marren D, Gardner DCJ und Oliver SG (1997). Suitability of replacement markers for functional analysis studies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1563-1573
- Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJA, Kötter P, Luttik MAH, van Dijken JP, Pronk JT (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 25, 15-37
- Baldacci G, Zennaro E (1982). Mitochondrial transcripts in glucose-repressed cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 127(2),411-416
- Belenkiy R, Haefele A, Eisen MB, Wohlrab H (2000). The yeast mitochondrial transport proteins: new sequences and consensus residues, lack of direct relation between consensus residues and transmembrane helices, expression patterns of the transport protein genes, and protein-protein interactions with other proteins. *Biochim Biophys Acta* 1467, 207-218
- Bhattacharjee JK (1985).  $\alpha$ -Aminoadipate pathway for the biosynthesis of lysine in lower eukaryotes. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 12(2), 131-151
- Boeke JD, LaCrute F, Fink GR (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* 197, 345-346
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254
- Brailsford MA, Thompson AG, Kaderbhai N, Beechey RB (1986). Pyruvate metabolism in castor-bean mitochondria. *Biochem J* 239, 355-361
- Brandriss MC, Magasanik B (1980). Proline: an essential intermediate in arginine degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bact* 143, 1403-1410
- Brenner C (2000). A cultivated taste for yeast. *Genome Biology* 1(1), reviews103.1-103.4

- Briquet M (1977). Transport of pyruvate and lactate in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 459, 290-299
- Bui DM, Gregan J, Jarosch E, Ragnini A, Schweyen RJ (1999). The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 274(29), 20438-20443
- Camacho JA, Obie C, Biery B, Goodman BK, Hu C-A, Almasanu S, Steel G, Casey R, Lambert M, Mitchell GA, Valle D (1999). Hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome is caused by mutations in a gene encoding a mitochondrial ornithine transporter. *Nature Genetics* 22, 151-158
- Chen XJ und Clark-Walker GD (1999). The petite mutation in yeasts: 50 years on. *Int Rev Cytol* 194, 197-238
- Cho JH, Lee YK, Chae CB (2001). The modulation of the biological activities of the mitochondrial histone Abf2p by yeast PKA and its possible role in the regulation of mitochondrial DNA content during glucose repression. *Biochim Biophys Acta* 175-186
- Cho JH, Ha SJ, Kao LR, Megraw TL, Chae C-B (1998a). A novel DNA-binding protein bound to the mitochondrial inner membrane restores the null mutation of mitochondrial histone Abf2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18(10), 5712-5723
- Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ und Davis RW (1998b). A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* 2 (1), 65-73
- Colombini M (1979). A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature* 279, 643-645
- Cooper TG (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. in: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression*. (Strather JN, Jones EW, Broach JR, eds) 39-100, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Crabeel M, Soetens O, De Rijcke M, Pratiwi R und Pankiewicz R (1996). The ARG11 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial integral membrane protein required for arginine biosynthesis. *J Biol Chem* 271 (40), 25011-25018
- Dang V-D, Bohn C, Bolotin-Fukuhara M, and Daignan-Fornier B (1996). The CCAAT Box-Binding Factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolism. *J Bact* 178 (7), 1842-1849
- Daum G, Böhni P und Schatz G (1982). Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 257, 13028-13033
- Davis RH (1986). Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 50(3), 280-313

- Dawson A, Klingenberg M, Krämer R (1987). Transport across membranes. in: *Mitochondria: a practical approach* (Darley-Usmar VM, Rickwood D und Wilson MT, eds.), 35-78, IRL Press, Oxford, England
- de Jesus Ferreira MC, Bao X, Laizé V, Hohmann S (2001). Transposon mutagenesis reveals novel loci affecting tolerance to salt stress and growth at low temperature. *Curr Genet* 40, 27-39
- Delforge J, Messenguy F und Wiame J-M (1975). The regulation of arginine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 57, 231-239
- de Risi JL, Vishwanath RI, Brown PO (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Nature* 278, 680-686
- Desagher S, Martinou J-C (2000). Mitochondria as central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10, 369-377
- de Vries S, Marres CAM (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim Biophys Acta* 895, 205-239
- de Winde JH, Grivell LA (1993). Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 46, 51-91
- Dickinson JR (1999). Carbon Metabolism. in: *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson JR, Schweizer M, eds) 23-56, Taylor & Francis Ltd, London
- Diffley JF, Stillman B (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17), 7864-7868
- Drgon T, Sabova L, Nelson N, Kolarov J (1991). ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 289(2), 159-162
- Drgon T, Sabova L, Gavurnikova G, Kolarov J (1992). Yeast ADP/ATP carrier (AAC) proteins exhibit similar enzymatic properties but their deletion produces different phenotypes. *FEBS Lett* 304(2-3), 277-280
- El Moulaj B, Duyckaerts C, Lamotte-Brasseur J und Sluse FL (1997). Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13(6), 573-581
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440, 325-331
- Fröhlich K-U, Madeo F (2000). Apoptosis in yeast - a monocellular organism exhibits altruistic behaviour. *FEBS Lett* 473, 6-9
- Gaertner FH, Shetty AS (1975). Hydroxykynureninase and the excretion of 3-hydroxyanthranilate by yeast. *Acta Vitaminol Enzymol* 29(1-6), 332-334
- Gancedo C und Serrano R (1989). Energy-yielding metabolism. in: *The yeasts* Vol. 3 2nd ed. (Rose AH, Harrison JS, eds.) 205-259, Academic Press, London

- Gancedo JM (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2), 334-361
- Gavurnikova G, Sabova L, Kissova I, Haviernik P, Kolarov J (1996). Transcription of the AAC1 gene encoding an isoform of mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by oxygen in a heme-independent manner. *Eur J Biochem* 239(3), 759-763
- Gawaz M, Douglas MG, Klingenberg M (1990). Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct AAC1 and AAC2 proteins in yeast. *J Biol Chem* 265(24), 14202-14208
- Gietz D, St. Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20, 1425
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546-552
- Grauslund M, Didion T, Kielland-Brandt MC, Andersen HA (1995). BAP2, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1269 (3), 275-280
- Gray MW, Burger G, Lang BF (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biology* 2(6), reviews1018.1-1018.5
- Gregan J, Bui DM, Pillich R, Fink M, Zsurka G, Schweyen RJ (2001a). The mitochondrial inner membrane protein Lpe10p, a homologue of Mrs2p, is essential for magnesium homeostasis and group II intron splicing in yeast. *Mol Gen Genet* 264, 773-781
- Gregan J, Kolisek M, Schweyen RJ (2001b). Mitochondrial Mg<sup>2+</sup> homeostasis is critical for group II intron splicing in vivo. *Genes Development* 15, 2229-2237
- Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24, 2519-2524
- Halestrap AP (1975). The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochem J* 148, 85-96
- Halestrap AP, Price NT (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343(Pt2), 281-299
- Hecker R (2002). Untersuchung subzellulärer Metabolitverteilungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation Universität zu Köln.
- Henry SA (1982). Yeast membrane lipids. in: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression*. (Strather JN, Jones EW, Broach JR eds) 101-158, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Hinnebusch AG (1988). Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52(2), 248-273
- Hodges PE, McKee AHZ, Davis BP, Payne WE, Garrels JI (1999). Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic Acids Research* 27, 69-73

- Hodges PE, Carrico PM, Hogan JD, O'Neill KE, Owen JJ, Mangan M, Davis BP, Brooks JE, Garrels JI (2002). Annotating the human proteome: the Human Proteome Survey Database (HumanPSDTM) and in-depth target database for G protein-coupled receptors (GPCR-PDTM) from Incyte Genomics. *Nucleic Acids Research* 30, 137-141
- Hofman-Bang J (1999). Nitrogen Catabolite Repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biotechnology* 12, 35-73
- Hollenberg CP, Riks WF und Borst P (1970). The glutamate dehydrogenases of yeast: extra-mitochondrial enzymes. *Biochim Biophys Acta* 201, 13-19
- Holst B, Lunde C, Lages F, Oliviera R, Lucas C, Kielland-Brandt MC (2000). GUP1 and its close homologue GUP2, encoding multimembrane-spanning proteins involved in active glycerol uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 37(1), 108-124
- Jauniaux J-C, Urrestarazu LA, Wiame J-M (1978). Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *J Bact* 133, 1096-1107
- Johnston M (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast. *Trends Genet* 15(1), 29-33
- Jones KD, Kompala DS (1999). Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures. *Journal of Biotechnology* 71, 105-131
- Kao LR, Megraw TL und Chae CB (1996). SHM1: A Multicopy Suppressor of a Temperature-Sensitive Null Mutation in the HMG1-like *abf2* Gene. *Yeast* 12(12), 1239-1250
- Kaplan RS, Mayor JA, Gremse DA, Wood DO (1995). High level expression and characterization of the mitochondrial citrate transport protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270, 4108-4114
- Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG, Andersson SGE (2000). The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast* 17, 170-187
- Kim DK, Kanai Y, Chairoungdua A, Matsuo H, Cha SH, Endou H (2001). Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent aromatic acid transporter with structural similarity to H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276(20), 17221-17228
- Kispal G, Csere P, Prohl C, Lill R (1999). The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J* 18(14), 3981-3989
- Kitamoto K, Yoshizawa K, Ohsumi Y, Anraku Y (1988). Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 2683-2686
- Klingenberg M, Nelson D (1995). Structure-function relationships in the mitochondrial carrier family. in: *Biochemistry of cell membranes* (Papa S, Tager JM eds.) 191-219, Birkhäuser Verlag, Basel

- Knirsch M, Gawaz MP, Klingenberg M (1989). The isolation and reconstitution of the ADP/ATP carrier from wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of primarily one type (AAC-2). *FEBS Lett* 244(2), 427-32
- Kolarov J, Kolarova N, Nelson N (1990). A third ADP/ATP translocator gene in yeast. *J Biol Chem* 265(21), 12711-12716
- Krämer R (1996). Structural and functional aspects of the phosphate carrier from mitochondria. *Kidney International* 49, 947-952
- Kreger-van Rij NJW (1987). in: *The yeasts* Vol. 1 2nd ed. (Rose AH, Harrison JS, eds.) 5-61, Academic Press, London
- Kresze GB, Ronft H (1981). Pyruvate dehydrogenase complex from baker's yeast. Purification and some kinetic and regulatory properties. *Eur J Biochem* 119, 573-579
- Lawson JE, Douglas MG (1988). Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of AAC2. *J Biol Chem* 263, 14812-14818
- Leuenberger HGW (1971). Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. 1. Growth kinetics of a respiratory deficient yeast strain grown in continuous culture. *Arch Mikrobiol* 79, 176-186
- Liu Z, Butow RA (1999). A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol* 19(10), 6720-6728
- Luttik MAH, Overkamp KM, Kötter P, de Vries S, van Dijken JP, Pronk JT (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* *NDE1* and *NDE2* genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem* 273(38), 24529-24534
- Makuc J, Paiva S, Schauen M, Krämer R, André B, Casal M, Leao C, Boles E (2001). The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast* 18(12), 1131-1143
- McAlpine DM, Perlman PS, Butow RA (2000). The numbers of individual mitochondrial DNA molecules and mitochondrial DNA nucleoids in yeast are co-regulated by the general amino acid control pathway. *EMBO J* 19(4), 767-775
- Messenguy F, Colin D, ten Have J-P (1980). Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur J Biochem* 108, 439-447
- Mewes HW, Albermann K, Bähr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maiertl A, Oliver SG, Pfeiffer F, Zollner A (1997). Overview of the yeast genome. *Nature* 387 (Supp), 7-8
- Mommsen TP, Hochachka PW (1981). Respiratory and enzymatic properties of squid heart mitochondria. *Eur J Biochem*, 120(2), 345-50
- Monod J (1949). The growth of bacterial cultures. *Ann Rev Microbiol* 3, 371-394
- Moyes CD, Buck LT, Hochachka PW, Suarez RK (1989). Oxidative properties of carp red and white muscle. *J Exp Biol* 143, 321-31

- Nalecz MJ, Nalecz KA, Azzi A (1991). Purification and characterization of the pyruvate (monocarboxylate) carrier from baker's yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim Biophys Acta* 1079(1), 87-95
- Nelissen B, de Wachter R, Goffeau A (1997). Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 21, 113-134
- Nelson DR, Felix CM, Swanson JM (1998). Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J Mol Biol* 277, 285-308
- Ogawa H, Nagamura Y, Ishiguro I (1983). Cinnabarinic acid formation in malpighian tubules of the silkworm *Bombyx mori*: reaction mechanism of cinnabarinic acid formation in the presence of catalase and manganese ions. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 364(11), 1507-1518
- Ohsumi Y (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature Reviews* 2, 211-216
- Palmieri L, De Marco V, Iacobazzi V, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE (1997a). Identification of the yeast ARG-11 gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS Letters* 410, 447-451
- Palmieri L, Lasorsa FM, de Palma A, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE (1997b). Identification of the yeast *ACR1* gene product as a succinate-fumarate transporter essential for growth on ethanol or acetate. *FEBS Letters* 417, 114-118
- Palmieri L, Lasorsa FM, Iacobazzi V, Runswick MJ, Palmieri F, Walker JE (1999). Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 462, 472-476
- Palmieri L, Agrimi G, Runswick MJ, Fearnley IM, Palmieri F, Walker JE (2001a). Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate. *J Biol Chem* 276(3), 1916-1922
- Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F, Erdmann R (2001b). Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *EMBO J* 20(18), 5049-5059
- Pande SV, Parvin R (1978). Pyruvate and acetoacetate transport in mitochondria. A reappraisal. *J Biol Chem* 253(5), 1565-1573
- Papa S, Paradies G (1974). On the mechanism of translocation of pyruvate and other monocarboxylic acids in rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* 49(1), 265-74.
- Paradies G, Petrosillo G, Gadaleta MN, Ruggiero FM (1999). The effect of aging and acetyl-L-carnitine on the pyruvate transport and oxidation in rat heart mitochondria. *FEBS Letters* 454, 207-209
- Parulekar SJ, Semones GB, Rolf MJ, Lievens JC, Lim HC (1986). Induction and elimination of oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 28, 700-710
- Perlman PS und Mahler HR (1970). Intracellular localization of enzymes in yeast. *Arch Biochem Biophys* 136, 245-259

- Phelps A, Schober CT, Wohlrab H (1991). Cloning and characterization of the mitochondrial phosphate transport protein gene from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 30, 248-252
- Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, van Dijken JP (1989). Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (2), 468-477
- Pronk JT, Thibaut JW, Luttik MAH, Klaassen CCM, Scheffers WA, Steensma HY, van Dijken JP (1994). Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 140, 601-610
- Pronk JT, Steensma HY, van Dijken JP (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 12, 1607-1633
- Qian J, Dolled-Filhart M, Lin J, Yu H, Gerstein M (2001). Beyond synexpression relationships: local clustering of time-shifted and inverted gene expression profiles identifies new, biologically relevant interactions. *J Mol Biol* 314(5), 1053-1066
- Regenberg B, Düring-Olsen I, Kielland-Brandt MC, Holmberg S (1999). Substrate specificity and gene expression of the amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 36, 317-328
- Rickwood D, Wilson MT and Darley-Usmar VM (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. in: *Mitochondria: a practical approach* (Darley-Usmar VM, Rickwood D und Wilson MT, eds.), 1-16, IRL Press, Oxford, England
- Rönnow B, Kielland-Brandt MC (1993). GUT2, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9, 1121-1130
- Rose AH, Harrison JS (1987). Introduction. in: *The yeasts* Vol. 1 2nd ed. (Rose AH, Harrison JS, eds.) 1-4, Academic Press, London
- Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A (2000). Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. *Clin Chim Acta* 294(1-2), 1-26
- Schmitt HD, Schröder-Köhne S (2000). Hefe, das eukaryontische *E.coli*. *MPIbpc News* 7/2000
- Schoolwerth AC, LaNoue KF, Hoover WJ (1983). Glutamate transport in rat kidney mitochondria. *J Biol Chem* 258(3), 1735-1739
- Schott H-H, Staudinger H (1971). The regulatory function of L-kynurenine 3-hydroxylase (EC 1.14.1.2) for the biosynthesis of pyridine nucleotides in anaerobically and aerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 352, 1654-1658
- Schuster R (1980). Determination of free amino acids by high performance liquid chromatography. *Anal Chem* 52 (4), 617-620
- Schuster R (1988). Determination of amino acids in biological, pharmaceutical, plant and food samples by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 431, 271-284

- Sharp PM, Li WH (1987). The codon adaptation index-a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* 15(3), 1281-1295
- Sherman F (1991). Getting started with yeast. *Meth Enzymol* 194, 3-20
- Shin M, Sano K, Umezawa C (1982). Effect of L-tryptophan and L-leucine on biosynthesis of niacin-related compounds in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 28(3), 179-189
- Small WC und McAlister-Henn L (1998). Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180, 4051-4055
- Soetens O, Crabeel M, El Moulaj B, Duyckaerts C und Sluse F (1998). Transport of arginine and ornithine into isolated mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 258, 702-709
- Takeuchi F, Otsuka H, Shibata Y (1983). Purification, characterization and identification of rat liver mitochondrial kynurenine aminotransferase with alpha-aminoadipate aminotransferase. *Biochim Biophys Acta* 743, 323-330
- Titheradge MA, Coore HG (1975). Initial rates of pyruvate transport in mitochondria determined by an "inhibitor-stop" technique. *Biochem J* 150, 553-556
- Urrestarazu LA, Vissers S, Wiame J-M (1977). Change in location of ornithine carbamoyltransferase and carbamoylphosphate synthetase among yeasts in relation to the arginase/ornithine carbamoyltransferase regulatory complex and the energy status of the cells. *Eur J Biochem* 79, 473-481
- Vaartjes WJ, Geelen MJH, van den Bergh SG (1979). Accumulation of pyruvate by isolated rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 548, 38-47
- van Dijken JP, Bauer J, Brambilla L, Duboc P, Francois JM, Gancedo C, Giuseppin MLF, Heijnen JJ, Hoare M, Lange HC, Madden EA, Niederberger P, Nielsen J, Parrou JL, Petit T, Porro D, Reuss M, van Riel N, Rizzi M, Steensma HY, Verrips CT, Vindeløv J, Pronk JT (2000). An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme Microb Technol* 26, 706-714
- van Roermund CW, Drissen R, van den Berg M, Ijlst L, Htetema EH, Tabak HF, Waterham HR, Wanders RJ (2001). Identification of a peroxisomal ATP carrier required for medium-chain fatty acid beta-oxidation and normal peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21(13), 4321-4329
- van Urk H, Schipper D, Breedveld GJ, Mak PR, Scheffers WA, and van Dijken JP (1989). Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochimica et Biophysica Acta* 992, 78-86
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8, 501-517
- Visser W, van Spronsen EA, Nanninga N, Pronk JT, Kuenen JG und van Dijken JP (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 67(3), 243-252

- Waldherr M, Ragnini A, Jank B, Teply R, Wiesenberger G, Schweyen RJ (1993). A multitude of suppressors of group II intron splicing defects in yeast. *Curr Genet* 24, 301-306
- Walker JE, Runswick MJ (1993). The mitochondrial transport protein superfamily. *J Bioenergetics Biomembranes* 25(5), 435-446
- Wang SS und Brandriss MC (1986). Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT1 gene. *Mol Cell Biol* 6(7), 2638-45
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 464(3), 123-128
- Wills C, Benhaim P und Martin T (1984). Effect of mutants and inhibitors on mitochondrial transport systems in vivo in yeast. *Biochim Biophys Acta* 778, 57-66
- Wu M, Repetto B, Glerum DM, Tzagoloff A (1995). Cloning and characterization of *FAD1*, the structural gene for the adenine dinucleotide synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 264-271
- Yaffe MP (1991). Analysis of mitochondrial function and assembly. *Meth Enzymol* 194, 627-643
- Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J, Langer T (2001). Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* 291, 2135-2138
- Zelenaya-Troitskaya O, Newman SM, Okamoto K, Perlman PS, Butow RA (1998). Functions of the high mobility group protein, Abf2p, in mitochondrial DNA segregation, recombination and copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148, 1763-1776



## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

Teilpublikationen:

Makuc J, Paiva S, Schauen M, Krämer R, André B, Casal M, Leão C, Boles E (2001). The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast* 18(12), 1131-1143

Datum:

Unterschrift:



## Danke

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben. Insbesondere gilt mein Dank:

Herrn Prof. Dr. Reinhard Krämer für die sehr kurzfristige Aufnahme in die Arbeitsgruppe, dafür, überhaupt immer alles möglich gemacht zu haben, für die immer offene Tür, viele hilfreiche Gespräche und die Chance, an etwas wirklich spannendem Forschen und Neues entdecken zu können.

Frau PD Dr. Sabine Waffenschmidt für die freundliche Übernahme des Korreferats als Abschluss ihrer Begleitung durchs Studium.

Herrn Dr. Michael Massow für die Betreuung und für das nicht nachlassende Interesse und Engagement, auch nach Ende der offiziellen Pflichten.

Herrn PD Dr. Eckhard Boles vom Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit, die mir die Chance gab, an etwas wirklich spannendem Forschen und Neues entdecken zu können. Außerdem für erhellende Diskussionen mit dem etwas anderen Blickwinkel des Genetikers.

Frau Judita Makuc vom Institut für Mikrobiologie der Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit und gute Diskussionen, insbesondere für die Herstellung der Hefestämme, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Prof. Dr. Nikolaus Pfanner von der Universität Freiburg, bei dem ich die Isolation intakter Mitochondrien aus Bäckerhefe lernen durfte.

Inga Bellahn, Markus Albertsen und vor allem Rolf Hecker für praktische Hilfe und hilfreiche Diskussionen in unserer kleinen Hefeeklave.

Andrea Meinhardt, Birgit Haier, Eva Glees, François Deuber, Michael Massow und Ute Meyer für die überaus freundliche Aufnahme in Büro und Labor und das sensationelle Arbeitsklima, das meine Frustrationstoleranz deutlich erhöhte.

allen anderen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe, besonders denen, die sich für das gute Arbeitsklima engagiert haben. André Müller, Andrea Faust, Andreas Burkovski, Andreas Wolf, Anja Wittmann, Anne Bendt, Astrid Wirtz, Carole Ngouoto-Nkili, Christian Troetschel, Christian Tschesche, Daniel Nottebrock, Daniela Kruse, Dirk Schiller, Dorothea Becker, Frank Schneider, Fritz Schmitz, Gabi Beckers, Gabi Sitek, Gregor Wersch, Hendrik Rönsch, Jana Meier-Wagner, Johannes Botzenhardt, Julia Strösser, Katharina Benova, Klaus Bollig, Lars Nolden, Maike Silberbach, Marcus Berger, Martin Weinand, Nina Moeker, Oliver Ley, Pilar Diaz-Achirica, Ralf Steger, René Rübenhagen, Sebastian Vreden, Suna Kandirali, Susanne Morbach, Udo Burger.

meiner Freundin Julia für alles.

meiner Familie für die ständige Unterstützung in Studium, Diplom, Promotion und im richtigen Leben.

