

Effekte von Deletionen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels im Zusammenhang mit chronologischem Altern und der intrazellulären Aminosäureverteilung

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Steve Michel

aus Dresden

2015

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe „Molekularbiologie des Stoffwechsels“ in der Abteilung „Analyse des Vertebratengenoms“ am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in der Zeit von April 2010 bis Oktober 2015 unter der Aufsicht von Dr. Markus Ralser und Prof. Dr. Hans Lehrach angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik
Innstraße 63-73
14195 Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
Institut für Biologie - Mikrobiologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 12-16
14195 Berlin

Datum der Disputation: 15.02.2016

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst einmal ganz besonders bei meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Markus Ralser bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat dieses spannende Projekt bearbeiten zu können und während meiner Promotionszeit durch seinen wissenschaftlichen Rat, seine kreativen Denkanstöße und seiner Persönlichkeit dazu beigetragen hat, dass ich dieses Projekt stets mit Freude bearbeitet habe.

Für das Interesse und gleichzeitig dem Vertrauen in das Gelingen dieser Arbeit sowie für die Begutachtung meiner Dissertationsschrift möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans Lehrach und Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel bedanken.

Ich möchte zudem allen ehemaligen und noch aktiven Mitarbeitern aus der AG Ralser für ihre enorme Unterstützung bei vielerlei Fragen und Problemen danken. Insbesondere möchte ich dabei Dr. Nana-Maria Grüning, Dr. Antje Krüger, Dr. Markus Keller und „last but not least“ Michael Mülleider (Ich schulde dir einiges!!!) einen großen Dank aussprechen. Ich danke euch besonders für die zahlreichen lustigen & „entspannenden“ Momente im Labor sowie für die stets angenehmen „afterwork activities“ und die sehr, sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Außerhalb meiner Arbeitsgruppe danke ich insbesondere Dr. Udo “-pedia“ Georgi, Anne Steininger, Sophia Schade und Dr. Bernd Timmermann für die stets motiverenden und helfenden Ratschläge! Bernd, du warst mir ein sehr guter stellvertretender Arbeitsgruppenleiter und Email-Account-Bürge :-). Achso...und natürlich einen Dank dafür, dass ich dein Druckerkonto durch den Ausdruck dieser Dissertation belasten durfte. :-)

Für die Erinnerung, dass es neben der Arbeit auch noch ein anderes Leben gibt, danke ich besonders meinen Freunden (samt Anhang) aus dem Weddingener bzw. Moabit-Kiez Puck, Maxi, den Köhns (jetzt kann man das endlich für euch beide verwenden), Chris und Caro (ja ich weiß...wohnst jetzt im Fhain!) sowie meinen Mainzer Freunden Kathi und Urban. Danke auch an alle Korrekturleser und sonstige Helfer (Paul S., Anita P., Andy D.) Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Freundin Frau C.

Danksagung

(Magdalena), dafür, dass sie den kompletten „Leidensweg“ dieser Dissertation von Anfang bis Ende mit mir durchgemacht hat. Danke für die unendlichen Stunden des Erörterns meiner thematischen Probleme und deine kreativen Lösungsvorschläge und für alle weiteren motivierenden Worte! Eigentlich müsst ich dir noch ein eigenständiges Kapitel widmen, aber das würde den Rahmen sprengen...du weißt ja Bescheid...MIAU!

Zu guter Letzt gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern und Großeltern, ohne die mein Studium und all das nachfolgende nicht möglich gewesen wären!!! Und... nein Mama...ich bin nach Abschluss dieser Arbeit noch immer kein Arzt :-)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xi
Abkürzungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Kohlenhydratstoffwechsel	2
1.1.1 Glycolyse und Gluconeogenese	2
1.1.2 Pentosephosphatweg	4
1.1.3 Citrat- und Glyoxalatzyklus	5
1.2 Biosynthese und Stoffwechsel von Aminosäuren	8
1.3 Umweltbedingte Anpassungen des Stoffwechsels	12
1.3.1 Der Prozess des Alterns	13
1.3.2 <i>S. cerevisiae</i> als Alterungsmodell	14
1.3.3 Replikatives Altern	15
1.3.3.1 Sirtuine und rDNA	16
1.3.3.2 Retrograde Antwort	17
1.3.4 Chronologisches Altern	18
1.3.4.1 Stressantwort im chronologischen Altern	18
1.3.4.2 Tor, Ras/cAMP-abhängige PKA, Sch9	20
1.3.4.3 Kalorierestriktion	22
1.3.5 Kohlenstoffmetabolismus bei <i>S. cerevisiae</i>	22
1.4 Systematische Studien des Metabolismus	24
1.5 Zielsetzung	26
2 Material	29
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
2.2 Chemikalien	31
2.3 Kits	32
2.4 Organismen	33
2.5 Nährmedien	36
2.6 Antibiotika	37
2.7 Puffer und Lösungen	38
2.8 Primer	39

2.9	Plasmide	40
2.10	Enzyme und Puffer	40
2.11	DNA-Standards	41
2.12	Software	41
3	Methoden	43
3.1	PCR	43
3.2	Kolonie-PCR von <i>S. cerevisiae</i>	44
3.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	44
3.4	Gelelektrophorese	44
3.5	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	45
3.6	Transformation von <i>E. coli</i>	45
3.7	Plasmidextraktion aus <i>E. coli</i>	46
3.8	DNA-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	46
3.9	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	46
3.10	Kreuzung von <i>S. cerevisiae</i>	47
3.11	Haploprofizienzscreen	48
3.12	Nicht-kompetitives Altern	48
3.13	Extraktion und Sequenzierung molekularer Barcodes	49
3.14	Extraktion von Zuckerphosphatmetaboliten	49
3.15	LC-MS/MS - Quantifizierung von Zuckerphosphaten	50
3.16	LC-MS/MS - Quantifizierung von Polyolen	51
3.17	Osmolalitätsmessungen	52
3.18	Stresstests	52
3.19	Extraktion von RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	52
3.20	cDNA-Synthese für qRT-PCR	53
3.21	qRT-PCR	53
3.22	Bestimmung der Wachstumsraten von Glycolyse-/PPP-Mutanten	53
3.23	Extraktion von Aminosäuren	54
3.24	Quantifizierung von Aminosäuren	54
4	Ergebnisse	57
4.1	Chronologische Alterungsexperimente von <i>S. cerevisiae</i> - Mutanten	57
4.1.1	Herstellung einer <i>S. cerevisiae</i> - Doppelmutantenbank	58
4.1.2	Haploprofizienzscreen	59
4.1.3	Identifizierung haploprofizienter Doppelmutanten	61
4.1.4	Chronologisches Altern von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	63
4.2	Charakterisierung von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	67
4.2.1	Zuckerphosphatprofil von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	67
4.2.2	Alditolprofile von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	69
4.2.3	Induktion von <i>NQM1</i> durch nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen	71

4.2.4	Induktion von <i>NQM1</i> durch Kalorierestriktion	73
4.2.5	<i>VHR1</i> -abhängige Induktion von <i>NQM1</i>	74
4.2.6	Induktion von <i>NQM1</i> durch osmotischen Stress	76
4.2.7	Induktion von <i>NQM1</i> durch oxidativen Stress	81
4.2.8	Zusammenfassung der Phänotypen von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	96
4.3	Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels	97
4.3.1	Wachstumsverhalten von Stoffwechselmutanten	98
4.3.2	Aminosäureprofil von Stoffwechselmutanten	104
4.3.2.1	Aminosäureprofile in SM-Glucose	105
4.3.2.2	Aminosäureprofile in SM-Galactose	116
4.3.2.3	Aminosäureprofile in SM-Ethanol	127
4.3.3	Zusammenfassung der Aminosäureverteilungsprofile	138
4.3.3.1	Vergleich der Aminosäureprofile	138
4.3.3.2	Effekte von Stoffwechselfusionen zwischen Glucose, Galactose, Ethanol.	141
4.3.3.3	Konzentrationstrend der Aminosäuren	142
4.3.3.4	Dynamik der Aminosäurekorrelationen	147
5	Diskussion	151
5.1	<i>VHR1</i> und <i>NQM1</i> - Mutanten	152
5.1.1	Chronologisches Altern	152
5.1.2	Metabolitprofile von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	156
5.1.3	Regulation von <i>NQM1</i> durch <i>VHR1</i>	161
5.2	Glycolyse-/ PPP-Mutanten	168
5.2.1	Wachstumsverhalten von Glycolyse-/ PPP-Mutanten	168
5.2.2	Deletions-/Umwelteffekte auf Aminosäureverteilung	174
5.2.2.1	Effekte von Kohlenstoffquellen	177
5.2.2.2	Stabilität des Aminosäurepools	179
5.2.2.3	Aminosäurekorrelationen	187
5.2.2.4	Nutzen von Aminosäureprofilen	189
6	Zusammenfassung	193
7	Summary	195
Literaturverzeichnis		197
Selbständigkeitserklärung		221

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht der Glykolyse, Gluconeogenese, Fermentation	4
2	Übersicht des PPP	5
3	Übersicht des Citrat-/Glyoxalatzyklus	7
4	Vorläufermetaboliten der Aminosäuren	10
5	Herstellung einer Hefedoppelmutantenbank	59
6	Viabilitätstrend im Haploprofizienzscreen	60
7	GO-Analyse haploprofizienter Doppelmutanten	62
8	Chronologisches Altern haploider <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	63
9	Chronologisches Altern heterozygoter <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten .	65
10	Chronologisches Altern prototropher <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten . .	66
11	Zuckerphosphatprofil von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	68
12	Alditolprofil von <i>VHR1</i> -, <i>NQM1</i> - Mutanten	70
13	Induktion von <i>NQM1</i> unter verschiedenen Kohlenstoffquellen	72
14	Induktion der <i>NQM1</i> - Expression nach Kalorierestriktion	73
15	<i>VHR1</i> - abhängige Induktion der <i>NQM1</i> - Expression	75
16	Osmolalitätstrend bei chronologischem Altern	76
17	Salz-/Osmostresstests von haploiden <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	78
18	Salz-/Osmostresstests von diploiden <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	79
19	Induktion von <i>NQM1</i> unter Salz- bzw. osmotischem Stress	80
20	CHP-Toleranz von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	83
21	H ₂ O ₂ -Toleranz von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	85
22	<i>t</i> -BHP-Toleranz von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	87
23	Diamid-Toleranz von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	89
24	Menadion-Toleranz von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	90
25	Menadion-Toleranz von stationären Kulturen	91
26	DTT-von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	92
27	NAC-Toleranz von von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	93
28	GSH-Toleranz von von <i>VHR1</i> , <i>NQM1</i> , <i>TAL1</i> - Mutanten	94
29	Induktion der <i>NQM1</i> - Expression bei oxidativen Stress	95
30	Wachstumsverhalten von Glycolysemutanten	99
31	Wachstumsverhalten von PPP-Mutanten	102
32	Aminosäureprofil von Glycolysemutanten in SM-Glucose	106
33	Aminosäureänderungen von Glycolysemutanten in SM-Glucose . . .	107

34	Vorläufermetaboliten von Aminosäuren	109
35	Pearsonkorrelation der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Glucose	110
36	Aminosäureprofil von PPP-Mutanten in SM-Glucose	112
37	Aminosäureänderungen von PPP-Mutanten in SM-Glucose	113
38	Pearsonkorrelation der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Glucose	115
39	Aminosäureprofil von Glycolysemutanten in SM-Galactose	117
40	Aminosäureänderungen von Glycolysemutanten in SM-Galactose	118
41	Pearsonkorrelation der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Galactose	120
42	Aminosäureprofil von PPP-Mutanten in SM-Galactose	122
43	Aminosäureänderungen von PPP-Mutanten in SM-Galactose	123
44	Pearsonkorrelation der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Galactose	126
45	Aminosäureprofil von Glycolysemutanten in SM-Ethanol	128
46	Aminosäureänderungen von Glycolysemutanten in SM-Ethanol	129
47	Pearsonkorrelation der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Ethanol	132
48	Aminosäureprofil von PPP-Mutanten in SM-Ethanol	134
49	Aminosäureänderungen von PPP-Mutanten in SM-Ethanol	135
50	Pearsonkorrelation der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Ethanol	137
51	Z-Transformation der Aminosäurekonzentrationen	139
52	Übergreifende Effekte von Stoffwechselfeletionen zwischen Glucose, Galactose, Ethanol.	141
53	Konzentrationstrend der Aminosäuren von Glycolysemutanten	143
54	Konzentrationstrend der Aminosäuren von PPP-Mutanten	145
55	Dynamik der Aminosäurekorrelationen	148

Tabellenverzeichnis

1	Biosynthesewege proteinogener Aminosäuren	11
2	Geräte/Verbrauchsmaterialien	29
3	Chemikalien	31
4	Kits	32
5	Bakterien	33
6	Hefen	33
7	Nomenklatur für Hefemutanten	33
8	Hefemutanten der heterozygoten Mutantenbank	34
9	Glycolyse-/PPP-Mutanten	35
10	Nährmedien für <i>E. coli</i>	36
11	Nährmedien für <i>S. cerevisiae</i>	36
12	Antibiotika	37
13	Puffer/Lösungen	38
14	Primer	39
15	Plasmide	40
16	Enzyme/Puffer	40
17	DNA-Standards	41
18	Software	41
19	PCR-Protokolle	43
20	Haploprofiziente Doppelmutanten	61
21	Initiale Zellzahl im haploiden Alterungsexperiment	64
22	Relative Wachstumsraten von Glycolysemutanten	100
23	Relative Wachstumsraten von PPP-Mutanten	103

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
1,3BPG	1,3-Bisphosphoglycerat
2PG	2-Phosphoglycerat
3PG	3-Phosphoglycerat
6PG	6-Phosphogluconat
Ac	Acetat
Ade	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
α-KG	α-Ketoglutarat
AMP	Adenosinmonophosphat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bspw	beispielsweise
bzw	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (cyclic AMP)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CES	kombinierte Verstärkerlösung (combinatorial enhancer solution)
CFU	Koloniebildende Einheit (colony forming unit)
CHP	Cumolhydroperoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CR	Kalorierestriktion
CSM	synthetisches Komplettmedium (complete synthetic media)
d.h.	das heißt
dATP	desoxyadenosintriphosphat
dCTP	desoxycytidintriphosphat
dd	doppelt destilliert
Δ	Kennzeichnung von deletierten Genen
dGTP	desoxyguanosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxythymidintriphosphat
E4P	Erythrose-4-phosphat
ERC	extrachromosomale rDNA-Ringe (extrachromosomal rDNA circles)
F1,6BP	Fructose-1,6-Bisphosphat
F6P	Fructose-6-phosphat
FAD ⁺	oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH ₂	reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
fwd	vorwärts (forward)
g	Gramm
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
GAAC	generelle Aminosäurekontrolle (general amino acid control)
Gal	Galactose
GCR	Glucosekatabolitrepession (glucose catabolite repression)
Glc	Glucose
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat (Glutaminsäure)
Gly	Glycin
GSH	Gluthation
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
His	Histidin
Ile	Isoleucin
kb	Kilobasen
l	Liter
lac	Lactose
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	molar
m/s	Meter pro Sekunde
Mena.	Menadion
Met	Methionin
mg	milligramm
min	Minuten
ml	milliliter

mM	millimolar
mmol	millimol
MRM	Beobachtung multipler Reaktionen (multiple reaction monitoring)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Massenspektrometrie
mTOR	Homolog zu TOR in Säugetieren (mammalian target of rapamycin)
NAC	N-Acetylcystein
NAD ⁺	oxidiertes Nikotinamidadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nikotinamidadenindinucleotid
NADP ⁺	oxidiertes Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nikotinamidadenindinucleotidphosphat
NCR	Stickstoffkatabolitrepession (nitrogen catabolite repression)
NEB	New England Biolabs
ng	nanogramm
NH ₄ ⁺	Ammoniumion
nm	nanometer
OD	optische Dichte
ORF	Leserahmen (open reading frame)
OxAc	Oxalacetat
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEP	Phosphoenolpyruvat
Pfu	Pyrococcus furiosus
pg	picogramm
Phe	Phenylalanin
Phe	Phenylalanin
P _i	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
pmol	picomol
PPP	Pentosephosphatweg
Pro	Prolin
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
Pyr	Pyruvat
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
R5P	Ribose-5-phosphat
Ras	Rattensarkom (rat sarcoma)
rDNA	ribosomale DNA
rev	rückwärts (reverse)
Ri5P	Ribulose-5-phosphat
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
S7P	Sedoheptulose-7-phosphat
SC	synthetisch komplett (synthetic complete)

Abkürzungsverzeichnis

sec	Sekunden
Ser	Serin
SM	synthetisches Minimalmedium
SOD	Superoxiddismutase
SRM	Beobachtung ausgewählter Reaktionen (selective reaction monitoring)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>t</i> -BHP	tertiäres (<i>t</i>)-Butylhydroperoxid
Thr	Threonin
TOR	Zielmolekül von Rapamycin (target of rapamycin)
t-RNA	Transport RNA
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Einheit (units)
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
ÜNK	über Nacht Kultur
Ura	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
uvm	und viele mehr
v/v	Volumen pro Volumen
Val	Valin
vgl	vergleiche
Vol	Volumen
w/o	ohne (without)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
Wt	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung
X5P	Xylulose-5-phosphat
YNB	stickstoffhaltiges Hefe-Kulturmedium (yeast nitrogen base)
YPD	Hefe-Komplexmedium (yeast extract peptone dextrose)

1 Einleitung

Das Leben auf der Erde in allen seinen zahlreichen Ausprägungsformen ist oberflächlich betrachtet nur ein geordnetes komplexes Zusammenspiel organischer Verbindungen, welche mittels physikalischer und chemischer Wechselwirkung mit ihrer Umwelt in Verbindung stehen. Im engeren Sinne lässt sich die Definition von biologischen Leben jedoch noch weiter spezifizieren. Demnach sind lebende Systeme offene, negativ entropische Systeme, da sie zu ihrem Erhalt in einem ständigen Energie- und Stoffaustausch mit ihrer Umwelt stehen müssen [1]. Die Gesamtheit aller möglichen chemischen Prozesse innerhalb eines Lebewesens, welche in der Umwandlung chemischer Moleküle resultieren, bezeichnet man als Stoffwechsel (Metabolismus). Der Metabolismus gewährleistet zellulären Organismen die Versorgung mit Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) und dient durch seine anabolischen und katabolischen Reaktionen der Synthese, der Umwandlung und der Degradation diverser biologisch wirksamer Moleküle, welche u.a. für das Zellwachstum, die Zellteilung und die Signaltransduktion von essentieller Bedeutung sind. Der Metabolismus ist zudem, als Vermittler und Reporter von umweltbedingten Reizen und Stimuli in der Lage schnell auf interne und externe Störungen zu reagieren und durch adäquate Reaktionen in Verbindung der verschiedenen regulatorischen Ebenen der Zelle (Metabolom, Proteom, Transkriptom) eine Adaptation gegen die auftretenden Störungen zu vermitteln und damit zur Aufrechterhaltung der funktionellen Integrität des Organismus beizutragen.

1.1 Kohlenhydratstoffwechsel

1.1.1 Glycolyse und Gluconeogenese

Die Glycolyse zählt zu den evolutionär ältesten, katabolischen Stoffwechselwegen und findet sich in ihrer konservierten Form bei fast allen lebenden Organismen [2]. Die Glycolyse, deren biochemische Reaktionen im Cytosol ablaufen, beschreibt die enzymkatalysierte, schrittweise Oxidation von einem Molekül Glucose zu zwei Molekülen Pyruvat. Neben Glucose können zahlreiche weitere Monosaccharide (Galactose, Fructose, Mannose uvm.) über die Glycolyse oxidiert werden, wobei sie dabei an unterschiedlichen Positionen in den Stoffwechselweg eingeführt werden. Während dieser Oxidationsprozesse werden neben Pyruvat zwei Moleküle ATP und ein Molekül reduziertes Nicotinamiddinukleotid (NADH) gebildet, welches eines der wichtigsten, energiereichen Reduktionsäquivalente der Zelle darstellt. Daneben sind die zahlreichen Metaboliten der Glycolyse Ausgangspunkte zur Biosynthese von Speicherstoffen (bspw. Glycerol, Trehalose), Lipiden (Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat) und Aminosäuren (ausgehend von Pyruvat, 3-Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat).

Die Glycolyse kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen stattfinden und resultiert in beiden Fällen in der Bildung von Pyruvat. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat innerhalb des Citratzyklus weiter oxidiert und die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente NADH und reduziertes Flavin-Adenindinukleotid (FADH₂) werden in der darauffolgenden mitochondrialen Elektronentransportkette abschließend zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser verwendet. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat unter NADH-Verbrauch entweder über die Lactatdehydrogenase zu Lactat umgesetzt oder durch die Alkoholdehydrogenase über den Zwischenschritt Acetaldehyd zu Ethanol reduziert [3]. Für *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist die fermentative Umsetzung von Pyruvat zu Ethanol charakteristisch, während für höhere Eukaryoten und vor allem bei Milchsäurebakterien die fermentative Produktion von Lactat bevorzugt genutzt wird. Da die resultierenden Verbindungen des fermentativen Umsatzes von Pyruvat weiterhin energiereich sind, können Ethanol bzw. Lactat weiter umgesetzt werden. In *S. cerevisiae* wird Ethanol nachträglich unter Bildung von Acetat respirativ

umgesetzt und durch Umwandlung in Acetyl-Coenzym A (CoA) dem Citratzyklus zugeführt [3].

Die Gluconeogenese dient dem Aufbau von Glucose, wenn die Versorgung mit Glucose unter bestimmten Bedingungen nicht stattfinden kann, bspw. durch umweltbedingten Glucosemangel bzw. bei Verfügbarkeit anderer Kohlenstoffquellen wie Ethanol, Acetat, Lactat oder Glycerol. Die Gluconeogenese nutzt dabei prinzipiell die gleichen Reaktionen wie die Glycolyse. Einige glykolytische Reaktionen sind jedoch irreversibel und müssen dementsprechend umgangen werden. Dies betrifft hauptsächlich die Reaktionen der Hexokinasen, der Phosphofruktokinasen sowie der Pyruvatkinasen. Ausgehend von Pyruvat wird dabei der terminale glykolytische Schritt (Pyruvatkinase) durch die beiden Enzyme Pyruvatcarboxylase und Phosphoenolpyruvatcarboxykinase umgangen, wobei im ersten Schritt Pyruvat, unter ATP-Verbrauch, zu Oxalacetat umgesetzt wird und dieses nachfolgend, unter Guanosintriphosphat(GTP)-Verbrauch, zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt wird. Im weiteren Verlauf wird die Phosphofruktokinase-reaktion mittels des Enzyms Fructose-1,6-bisphosphatase umgangen und im letzten Schritt die Bildung von Glucose aus Glucose-6-phosphat, durch die Umgehung der Hexokinasen über die Glucose-6-phosphatase, abgeschlossen. Bei Eukaryoten finden die Reaktionen der Gluconeogenese gewöhnlich im Cytosol, im Mitochondrium (Reaktionen der Pyruvatcarboxylase/PEP-Carboxykinase) und im Endoplasmatischen Retikulum (Reaktion der Glucose-6-phosphatase) statt. Bei *S. cerevisiae* laufen die drei Reaktionen höchstwahrscheinlich nur im Cytosol ab [4].

Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht der innerhalb der Glycolyse und Gluconeogenese ablaufenden Prozesse, inklusive der beteiligten Gene.

1 Einleitung

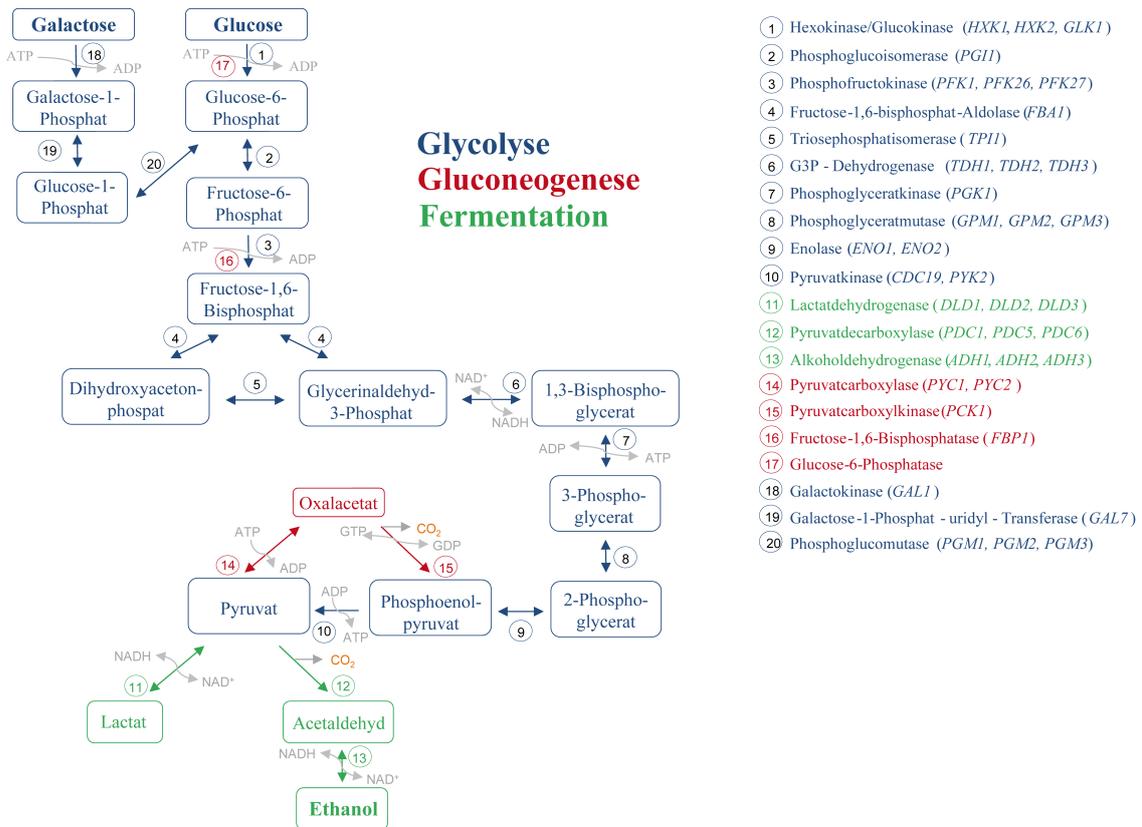


Abbildung 1: Übersicht der Glykolyse, Gluconeogenese, Fermentation. Die Abbildung zeigt eine schematische Übersicht der wichtigsten Stoffwechselreaktionen der Glykolyse (blau), der Gluconeogenese (rot) und der Fermentation (grün). Die beteiligten Enzyme sind inklusive ihrer codierenden Gene angegeben. Die Eintrittspunkte der drei Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose, Ethanol sind hervorgehoben.

1.1.2 Pentosephosphatweg

Der Pentosephosphatweg (PPP) ist neben der Glykolyse ein weiterer Stoffwechselweg der zur Verwertung von Kohlenhydraten verwendet wird. Die Funktionen des PPP liegen vor allem in der Bildung von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und diverser Zuckerphosphatintermediate, welche im späteren Verlauf zur Biosynthese von bspw. Nukleotiden, Nuklein- und Aminosäuren verwendet werden. Der PPP besteht aus zwei separaten Teilen: dem oxidativen und nicht-oxidativen Teil (Abbildung 2).

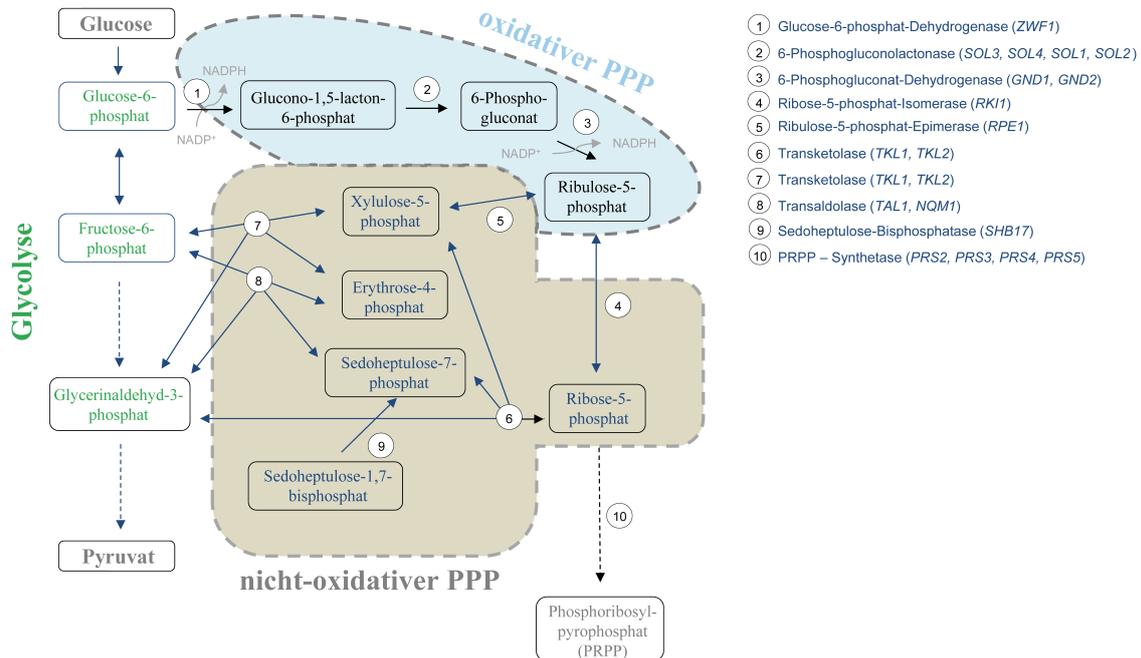


Abbildung 2: Übersicht des Pentosephosphatwegs. Schematische Übersicht der Reaktionen des PPP. Die Übersicht zeigt glykolytische Intermediate welche Teil des PPP sind (grün), Intermediate des oxidativen Teils des PPP (schwarz) sowie Intermediate des nicht-oxidativen Teils des PPP (blau). Weitere Intermediate, welche aus Glycolyse oder PPP hervorgehen sind grau gekennzeichnet.

Im oxidativen Teil wird Glucose-6-phosphat über mehrere irreversible enzymatische Reaktionen unter NADPH-Bildung zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt. Der PPP stellt daher, neben den von oxidiertem Nicotinamidnucleotid (NADP⁺)-abhängigen Isocitratdehydrogenasen (Idp1p, Idp2p, Idp3p) und der Glutaminolyse, eine der wichtigsten zellulären Quellen zur Gewinnung von NADPH dar und nimmt damit in der Abwehr von oxidativen Stress eine zentrale Rolle ein [5–8]. Neben der Bildung von NADPH erzeugt bzw. transformiert der PPP im nicht-oxidativen Teil durch verschiedene reversible Enzymkatalysen zahlreiche Zuckerphosphate (C₃-, C₄-, C₅-, C₆-, C₇-Körper), welche nachfolgend zur Synthese von bspw. ATP, NADH, FAD, CoA verwendet werden.

1.1.3 Citrat- und Glyoxalatzyklus

Der Citratzyklus, als mitochondrialer Stoffwechselweg, ist in seiner Funktion einer der Hauptumschlagplätze des intrazellulären Metabolismus, da er sowohl den Ausgangs- als auch Endpunkt für diverse anabolische bzw. katabolische Reaktionen

von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Lipiden darstellt. Eine der Hauptfunktionen des Citratzyklus liegt in der Verstoffwechslung von Acetyl-CoA, welches durch den Abbau von Kohlenhydraten (Glycolyse), der β - Oxidation von Fettsäuren oder beim Abbau der Aminosäuren entsteht. Acetyl-CoA wird dabei zu Beginn mit Oxalacetat zu Citrat verknüpft und führt in sieben weiteren, enzymkatalysierten Schritten, welche in der Bildung diverser Zwischenprodukte resultieren und wichtige Ausgangsstoffe für zahlreiche biosynthetische Prozesse wie bspw. Teile der Aminosäure-, Häm-, Fettsäurebiosynthese sind, zur Bildung von zwei Molekülen Kohlenstoffdioxid (CO_2), 3 NADH, 1 FADH_2 , 1 GTP, wobei Oxalacetat zusätzlich regeneriert wird. Daneben kann Oxalacetat auch durch die anaplerotische Reaktion der Pyruvatcarboxylase entstehen, wobei diese Pyruvat, unter Addition von CO_2 und unter ATP-Verbrauch, direkt zu Oxalacetat umwandelt. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat durch weitere Stoffwechselprozesse unter hohem Energiegewinn in Form von ATP vollständig in CO_2 und Wasser umgewandelt. Dazu wird Pyruvat nachfolgend über den Pyruvatdehydrogenasekomplex oxidativ decarboxyliert und in Acetyl-CoA umgewandelt, welches daraufhin in Kombination mit Oxalacetat als Citrat in den Citratzyklus eingeführt wird. Die zusätzlich entstehenden Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH_2 können anschließend ihre Elektronen auf die Komponenten der, an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten, mitochondrialen Atmungskette (Elektronentransportkette) übertragen. Über eine Reihe von Redoxreaktionen werden die Elektronen dabei von NADH und FADH_2 über die Atmungskettenkomponenten auf den finalen Akzeptor Sauerstoff übertragen, wodurch dieser zu Wasser reduziert wird. In der Regel besteht die eukaryotische Atmungskette aus vier Komplexen (Komplex I - IV), wobei zwischen Komplex II und Komplex III Ubiquinon und zwischen Komplex III und Komplex IV Cytochrom *c* als weitere Elektronenüberträger verwendet werden. Bei *S. cerevisiae* fehlt jedoch Komplex I, sodass die Elektronen von NADH über verschiedene Oxidoreduktasen (Nde1p, Nde2p, Ndi1p, Gut2p), jedoch ohne den sonst typischen parallel ablaufenden Protonenexport, der Atmungskette zugefügt werden [9]. Durch die, bei diesem Prozess, freigesetzte Energie wird nachfolgend (durch Komplex II - IV) ein Protonengradient im Intermembranraum der Mitochondrienmembran aufgebaut, welcher durch die Aktivität der ATP-Synthase zur ATP-Gewinnung genutzt wird (Chemiosmotische Kopplung [10]). Dieser Prozess führt generell zur höchsten ATP-Ausbeute des intra-

zellulären Stoffwechsels ($\sim 30\text{-}36$ Moleküle ATP). Eine schematische Übersicht der wichtigsten Intermediate des Citrat- und Glyoxalatzyklus zeigt Abbildung 3.

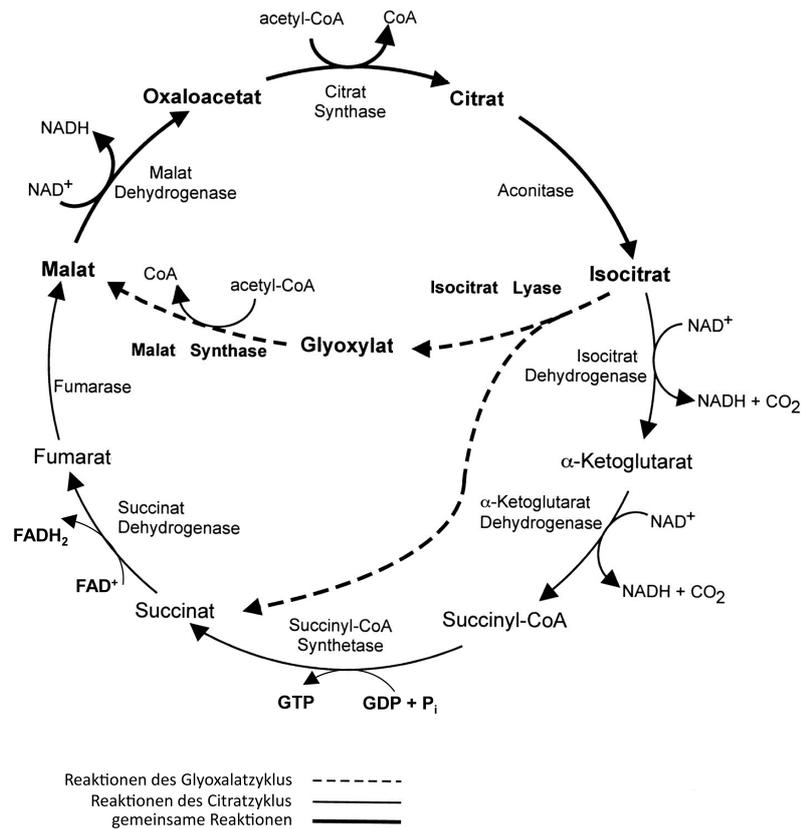


Abbildung 3: Übersicht des Citrat-/Glyoxalatzyklus. Schematische Übersicht der enzymatischen Reaktionsschritte des Glyoxalatzyklus (gestrichelte Linien) und des Citratzyklus (dünne Linien). Die gemeinsamen Reaktionen beider Zyklen sind durch dicke Linien dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert aus Lorenz *et al.* [11].

Ein dem Citratzyklus prinzipiell sehr ähnlicher Stoffwechselweg, der sich einige Metaboliten mit dem Citratzyklus teilt, ist der Glyoxalatzyklus. Die primäre Funktion des Glyoxalatzyklus liegt in der Gewährleistung des weiteren Zellwachstums und der damit verbunden Biosynthese von Kohlenhydraten unter Glucosemangelbedingungen, wobei in diesen Fällen alternative Kohlenstoffquellen (C_2 -Körper) wie bspw. Acetat und Ethanol verwendet werden [12]. Der Glyoxalatzyklus findet sich ausschließlich im Reich der Pflanzen, Pilze und Bakterien sowie bei einigen Invertebraten,

jedoch nicht bei Vertebraten [13]. Das charakteristische am Glyoxalatzyklus ist einerseits, dass insgesamt 2 Moleküle Acetyl-CoA umgesetzt werden (Citratzyklus nutzt nur 1 Acetyl-CoA) und andererseits, dass er die Decarboxylierungsschritte, welche im normalen Citratzyklus durch die Isocitratdehydrogenase sowie durch die α -Ketoglutaratdehydrogenase katalysiert werden, umgeht und ausgehend von Isocitrat mittels der Isocitratlyase zur Bildung von Glyoxalat und Succinat führt. Glyoxalat wird nachfolgend durch die Malatsynthase in Kombination mit einem weiteren Acetyl-CoA Molekül in Malat überführt, welches danach über das Enzym Malatdehydrogenase wieder in Oxalacetat umgewandelt wird, sodass der Pool an Oxalacetat regeneriert werden kann. Succinat wird analog zum Citratzyklus weiter verarbeitet (über Fumarat, Malat zu Oxalacetat). Einige Mikroorganismen besitzen die notwendigen Enzyme des Glyoxalatzyklus (Isocitratlyase, Malatsynthase) jedoch nicht und verwenden daher andere Synthesewege, wie bspw. den Ethylmalonyl-CoA - Weg [14] bzw. den Methylaspartatzyklus [15], um u.a. die Biosynthese von Kohlenhydraten unter Acetatassimilation zu gewährleisten.

1.2 Biosynthese und Stoffwechsel von Aminosäuren

Aminosäuren sind die Grundbausteine zellulärer Proteine und erfüllen dadurch zahlreiche Funktionen innerhalb des Zellstoffwechsels. Sie fungieren als Signalmoleküle und können durch ihren Abbau als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dienen [16]. Aminosäuren werden entweder über die Umwelt aufgenommen oder über Ammonium (NH_4^+) in Kombination mit einer Kohlenhydratquelle synthetisiert. Um Aminosäuren bzw. andere Stickstoffquellen für die diversen biosynthetischen Reaktionen der Zelle nutzen zu können, muss primär deren Internalisierung gewährleistet werden, was über verschiedene Aminosäurepermeasen garantiert wird. Beispielsweise können extrazelluläre Aminosäuren in der Regel selbstständig ihre Aufnahme vermitteln, indem sie die Expression von spezifischen Permeasen induzieren. Die Aminosäuren werden dabei über verschiedene Mechanismen, wie bspw. durch den, in der Plasmamembran lokalisierten, Aminosäuresensor Ssy1p erkannt, welcher Teil des Ssy1-Ptr3-Ssy5 (SPS) - Sensorwegs ist [16]. Die Bindung an Ssy1p aktiviert über die Proteine Ptr3p, Ssy5p und Grr1p die Transkriptionsfaktoren

Stp1p und Stp2p, welche daraufhin die Expression der Permeasen einleiten [17, 18]. Nach erfolgter Aufnahme können die Aminosäuren daraufhin u.a. entweder direkt für Biosyntheseprozesse verwendet werden bzw. durch Deaminierung in Ammonium umgewandelt oder als Substrate für Transaminierungsreaktionen verwendet werden [19]. Die selektive Aufnahme von Aminosäuren bei ausreichender Verfügbarkeit wird zudem über den Weg der Stickstoffkatabolitrepression (NCR) gesteuert und ermöglicht den Zellen die selektive Aufnahme bevorzugter Aminosäuren bzw. Stickstoffquellen entsprechend ihrer Qualität [16]. Das Qualitätskriterium ist empirischen Ursprungs und bedeutet vor allem inwiefern die Aminosäure das Wachstum bzw. die Aufnahme anderer Aminosäuren positiv und negativ beeinflusst. Bspw. gelten Prolin, Allantoin und Harnstoff als weniger bevorzugte und Glutamin und Asparagin als bevorzugte Stickstoffquellen [20]. Der NCR-Signalweg induziert daher die Expression von Genen des Stickstoffstoffwechsels bevorzugter Aminosäuren und reprimiert die Expression von Genen zur Verwertung nicht bevorzugter Aminosäuren. Unter Aminosäuremangelbedingungen erfolgt die Aktivierung des generellen Aminosäurekontrollwegs (GAAC). Dieser Weg zur Stressabwehr registriert über Gcn2p den Mangel an Aminosäuren und phosphoryliert daraufhin den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 (eIF2) [21]. Dies führt nachfolgend zu einer allgemein reduzierten Translation, sodass die Zelle einerseits Ressourcen sparen kann und andererseits das Transkriptom als Antwort auf den Nährstoffmangel rekonfigurieren kann. Des Weiteren führt die Phosphorylierung von eIF2 zu einer gesteigerten Translation der *GCN4* mRNA [21]. *GCN4* ist ein Hauptregulator des Aminosäurestoffwechsels in *S. cerevisiae*, welcher eine Vielzahl von Genen für die Biosynthese von individueller Aminosäuren reguliert [22] und daraufhin die Synthese der mangelnden Aminosäuren aktiviert. Durch die Modulation der NCR bzw. des GAAC-Wegs durch Gcn4p kann die Zelle auf transkriptioneller und translationaler Ebene die Biosynthese der Aminosäuren steuern [16]. Weitere Regulationen innerhalb der individuellen Aminosäurebiosynthesewege sind durch klassische Regulationsmechanismen, basierend auf Rückkopplungsmechanismen wie Endprodukthemmung (Argininsynthese), gekoppelte Produkthemmung mit transkriptioneller Regulation (Lysinsynthese) oder nicht-kodierende RNAs (Methioninsynthese), möglich [16].

Die Biosynthese der proteinogenen Aminosäuren erfolgt primär ausgehend von metabolischen Vorläufern, welche als Intermediate in den drei Hauptstoffwechselwegen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels Glycolyse, PPP und Citratzyklus entstehen.

1 Einleitung

Diese Vorläufer bilden das strukturelle Kohlenstoffgerüst der Aminosäuren. Eine Übersicht der metabolischen Vorläufer und der daraus resultierenden Aminosäuren gibt Abbildung 4.

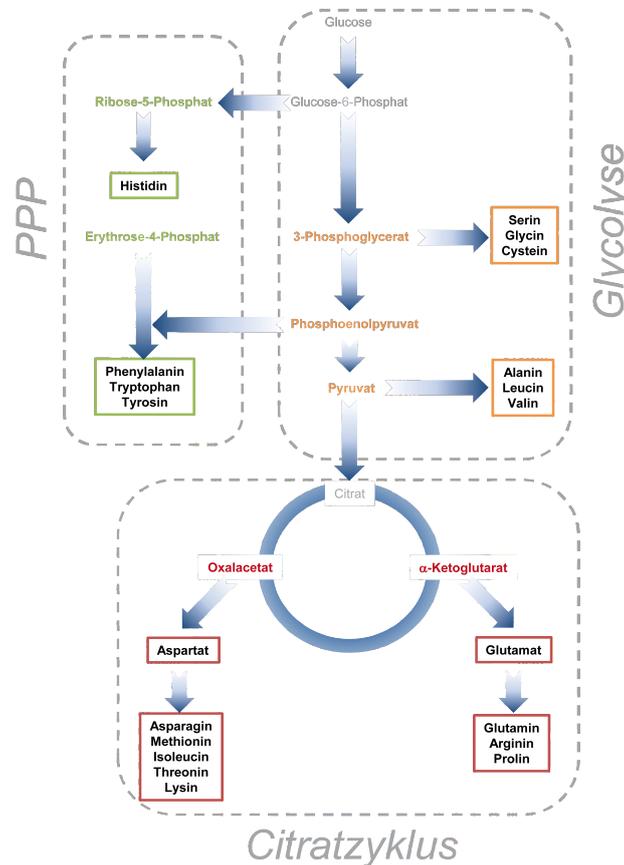


Abbildung 4: Übersicht der Aminosäurevorläufermetaboliten. Die metabolischen Vorläufer zur Synthese der proteinogenen Aminosäuren sind entsprechend ihres Stoffwechselweges farblich gekennzeichnet. PPP-Metaboliten (grün), Glycolysemetaboliten (orange), Citratzyklusmetaboliten (rot), Zwischenprodukte der Stoffwechselwege (grau).

Anhand dieses primären Kohlenstoffgerüsts werden nun, spezifisch für jede Aminosäure, weitere Biosynthesewege aktiviert, die zum Aufbau der endgültigen Aminosäureform dienen. Diese spezifischen und teils sehr komplexen Biosynthesewege sowie die für jede Aminosäure individuell notwendigen Enzyme sind Tabelle 1 zu entnehmen.

1.2 Biosynthese und Stoffwechsel von Aminosäuren

Tabelle 1: Biosynthesewege proteinogener Aminosäuren

Aminosäure	Synthese über	Besonderheiten	Synthesegene
Serin	3PG		<i>SER33, SER1, SER2, SER3</i>
	Glycin		<i>SHMT1, SHMT2</i>
Glycin	Threonin		<i>GLY1</i>
	Serin		<i>SHMT1, SHMT2</i>
	Glyoxalat		<i>AGX1</i>
Phenylalanin	PEP+E4P/ Chorismat	Shikimsäureweg	<i>ARO7, PHA2, ARO8, ARO9</i>
Tyrosin	PEP+E4P/ Chorismat	Shikimsäureweg	<i>ARO7, TYR1, ARO8, ARO9</i>
Tryptophan	PEP+E4P/ Chorismat	Shikimsäureweg	<i>TRP2, TRP3, TRP4, TRP1, TRP5</i>
Histidin	R5P	über PRPP	<i>PRS1, PRS2, PRS3, PRS4, PRS5, HIS1, HIS2, HIS3, HIS4, HIS5, HIS6, HIS7</i>
Alanin	Pyruvat	respirativ	<i>ALT1</i>
	Pyruvat	fermentativ	Glutamin - Aminotransferase, ω - Amidase
Valin	Pyruvat	Zwischenprodukt 2-Ketoisovalerat	<i>ILV6, ILV2, ILV5, ILV3, BAT2, BAT1</i>
Leucin	Pyruvat 2-Ketoisovalerat		<i>LEU9, LEU4, LEU1, LEU2, BAT1, BAT2</i>
Isoleucin	Threonin		<i>ILV1, ILV6, ILV2, ILV5, ILV3, BAT1, BAT2</i>
Aspartat	Oxalacetat		<i>AAT1, AAT2</i>
Asparagin	Aspartat		<i>ASN1, ASN2</i>
Threonin	Oxalacetat	über Homoserin	<i>HOM3, HOM2, HOM6, THR1, THR4</i>
Lysin	Oxalacetat	α -Amino adipatweg	<i>LYS21, LYS22, LYS4, LYS12, LYS2, LYS9, LYS1</i>
Methionin	Homoserin / H ₂ S / Homocystein / Intermediate der Folatsynthese	Kombination mehrerer Synthesewege	

Glutamat	α -KG + NH_4^+		<i>GDH1, GDH3</i>
	Glutamin / α -KG		<i>GLT1</i>
Glutamin	Glutamat + NH_4^+		<i>GLN1</i>
Arginin	Glutamat	Zwischenprodukt	<i>ARG2, ARG7, ARG5,</i>
		Ornithin	<i>ARG6, ARG8, ARG3,</i> <i>ARG1, ARG4</i>
Prolin	Glutamat		<i>PRO1, PRO2, PRO3</i>

3-Phosphoglycerat (3PG), Phosphoenolpyruvat (PEP), Erythrose-4-phosphat (E4P), Ribose-5-phosphat (R5P) α -Ketoglutarat (α -KG), Ammoniumion (NH_4^+), Schwefelwasserstoff (H_2S), Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP)

1.3 Umweltbedingte Anpassungen des Stoffwechsels

Eine Voraussetzung zur Funktionalität von Stoffwechselsystemen ist zum einen die Robustheit des Stoffwechsels gegenüber Perturbationen und zum anderen die dynamische Anpassung des Stoffwechsels an sich verändernde Umweltbedingungen, welche zusammen das Überleben komplexer Organismen sichern. Die funktionellen Einheiten des metabolischen Netzwerks werden als metabolische Module bezeichnet und zeichnen sich durch eine spezifische Regulation aus [23]. Diese Regulationen können sowohl intramodular als auch intermodular erfolgen. Üblicherweise erfolgt die intramodulare Regulation u.a. durch die Anpassung der Enzymkonzentration (Expression/Depression der Gene) bzw. die Einflussnahme auf die Enzymkinetik infolge von kovalenten bzw. allosterischen Modifikationen, Inhibitoren und post-translationalen Modifikationen. Intramodular bietet sich aufgrund der seriellen Struktur der Stoffwechselwege zudem die Möglichkeit, über positive und negative Rückkopplungsmechanismen eine Regulation zu gewährleisten. Bei der negativen Rückkopplung wirkt klassischerweise das Substrat oder Produkt der Enzymkatalyse inhibitorisch auf das Enzym selbst bzw. auf ein weiter zurückliegendes Enzym der seriellen Kette. Positive Regulation erfolgt, wenn ein Produkt auf die Aktivität eines nachfolgenden Enzyms bzw. nachfolgende Enzyme aktivierend wirkt. Daran lässt sich erkennen, dass diese intramodularen Regulationsschleifen sowohl in funktioneller und topologischer Nähe als auch über gewisse Distanzen erfolgen können und dabei sogar in der Lage sind größere regulatorische Ebenen miteinander zu verbinden (bspw. *lac*-Operon bei *Escherichia coli* (*E. coli*) [24], Interkonnektion der metabolischen und

transkriptionellen Ebene). Eine weitere Möglichkeit die Robustheit metabolischer Netzwerke zu gewährleisten bietet die Verwendung von Isoenzymen, welche teilweise spezifisch für gewisse Bedingungen sind oder abweichende kinetische Eigenschaften aufweisen. Das zeigt sich unter anderem daran, dass die Deletionen zahlreicher Enzyme in *S. cerevisiae* keinen eindeutigen Phänotyp hervorrufen (Kompensation über funktionelle Paraloge), wohingegen für Enzyme ohne bekannte Paraloge häufig Änderungen im metabolischen Flux zu beobachten sind [25–27].

All diese regulatorischen Effekte manifestieren sich primär auf der Ebene der Enzyme und haben dadurch nachfolgend Auswirkungen auf den Gesamtflux des Stoffwechselweges und können somit auch andere Teile des metabolischen Netzwerks beeinflussen. Sie stellen der Zelle damit sehr schnelle und effiziente Mechanismen zur Verfügung, um sich gegebenenfalls auf umweltbedingte Perturbationen einzustellen. Um die zellulären Adaptationen bei den verschiedensten Störungen zu gewährleisten, müssen die spezifischen Reize bzw. Signale von der Zelle erkannt werden und nachfolgend zur Anpassung des Stoffwechsels auf metabolischer bzw. transkriptioneller Ebene verarbeitet werden (intermodulare Regulation). In der Regel werden dabei spezifische Signalwege verwendet, um die externen Stimuli intrazellulär zu verarbeiten bzw. um die vielseitigen metabolischen bzw. transkriptionellen Antworten der Zelle einzuleiten.

1.3.1 Der Prozess des Alterns

Der Prozess des Alterns ist sehr komplex und bis zum heutigen Tage noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt zahlreiche Theorien darüber, welche Prozesse das Altern begünstigen bzw. hervorrufen. Keine dieser Theorien ist bisher vollständig ausgereift, um alle Facetten der Alterung erklären zu können. Jedoch ergeben sich aus der Vielzahl der Theorien bereits verschiedene Aspekte, um die zelluläre bzw. den gesamten Organismus betreffende Alterung zu beschreiben. In der Regel lassen sich zwei Hauptaussagen zur Entstehung des Alterns differenzieren [28]. Einerseits wird von einer Art des programmierten Alterns ausgegangen, welches aktive, durch Gene gesteuerte, Kontrollmechanismen voraussetzt, die nachfolgend Signale an das Nerven-, Endokrin- und Immunsystem übertragen können. Diese Signale sind notwendig für die intrazelluläre Homöostase und für die Aktivierung von Abwehrmechanismen und sind vergleichbar mit den Signalen des programmierten Zelltods (Apoptose). Die

andere Gruppe von Theorien befasst sich mit der Akkumulation von funktionellen Störungen in den Zellen über den gesamten Lebensprozess. Diese Störungen können intrinsischen bzw. extrinsischen Ursprungs sein. Als intrinsische Faktoren werden u.a. reaktive Sauerstoffspezies [engl.: reactive oxygen species (ROS)] diskutiert, die nachfolgend DNA bzw. Proteine schädigen können. Weiterhin kommen DNA-Mutationen sowie Telomerverkürzung als Ursachen der Alterung in Frage. Extrinsische Faktoren sind unter anderem UV-Strahlung bzw. giftige Substanzen die nachfolgend intrazelluläre Schäden verursachen. Eine klare Abgrenzung der Mechanismen lässt sich jedoch nicht vornehmen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich der Alterungsprozess am ehesten als eine Kombination aller möglichen Mechanismen beschreiben lässt.

1.3.2 *S. cerevisiae* als Modellsystem des Alterungsprozesses

S. cerevisiae, umgangssprachlich als Bäckerhefe bezeichnet, ist ein einzelliger Organismus aus dem Reich der Pilze. *S. cerevisiae* war der erste eukaryotische Organismus dessen Genom im Jahre 1996 vollständig sequenziert wurde [29, 30]. Das haploide Genom ist verteilt auf 16 Chromosomen und besteht aus 12.071.326 Basenpaaren und ca. 6.604 proteincodierenden Genen von denen ca. 5.151 (78%) verifiziert sind ¹. *S. cerevisiae* wurde erstmals 1959 durch Mortimer und Johnston als Modellorganismus zum Studium des Alterungsprozesses vorgeschlagen und ist heute neben *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* ein universell akzeptiertes Modellsystem der Altersforschung [31]. In der Altersforschung bei *S. cerevisiae* unterscheidet man allgemein zwischen zwei Formen des Alterns. Zum einen gibt es das replikative Altern als Modell des Alterns proliferierender Zellen und andererseits das chronologische Altern als Modell des Alterns post-mitotischer Zellen [32]. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Stoffwechselwege und Proteine bzw. Modulatoren mit der Regulation der Lebensdauer bei *S. cerevisiae* in Verbindung gebracht. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Mechanismen erstaunliche Ähnlichkeiten zu den Regulatoren des Alterns in höheren Eukaryoten haben [33, 34], sodass angenommen werden kann, dass die vergleichbaren Mechanismen, welche über Speziesgrenzen hinweg operieren, auf eine evolutionäre Konservierung der Alterungsregulation zurückzuführen sind. Aufgrund der Tatsache, dass *S. cerevisiae*

¹*S. cerevisiae* - Genomdatenbank (SGD); <http://www.yeastgenome.org>, Stand Sept. 2015

sowohl im haploiden als auch diploiden Genotyp überleben kann und zusätzlich eine systematische Gendelektionsbank von *S. cerevisiae* zur Verfügung steht, eröffnen sich zudem die Möglichkeiten der Erzeugung von homo-/heterozygoten Deletionsbanken, welche nachfolgend in genomweiten Screens zur Identifikation verschiedener genetischer Interaktionen bzw. zur Identifikation zahlreicher Phänotypen der Alterung eingesetzt werden können.

1.3.3 Replikatives Altern

Das replikative Altern bzw. die replikative Lebensspanne (RLS) ist definiert durch die Anzahl der potenziellen Mitosen, die eine Mutterzelle durchlaufen kann, bevor sie seneszent wird und stellt damit ein Maß der replikativen Kapazität von Zellen während des vegetativen Wachstums dar [31, 35]. Die Zellteilung bei *S. cerevisiae* ist asymmetrisch, wodurch der Zellinhalt ungleich verteilt wird, sodass in der Mutterzelle spezifische Alterungsfaktoren wie bspw. extrachromosomale ribosomale DNA-Ringe [engl.: extra chromosomal rDNA circle (ERC)], beschädigte Proteine und Proteinaggregate verbleiben [36–39]. Weiterhin kann es durch externe Faktoren wie bspw. umweltbedingte Störungen (Hyperoxia) bzw. genetische Defekte (Deletionen von Antioxidanzenzymen wie Superoxiddismutasen (SOD bzw. Katalasen) zur Auslösung von oxidativen Stress kommen, was in der Akkumulation von ROS und nachfolgend der oxidativen Schädigung zellulärer Bestandteile resultiert und sich dadurch negativ als verkürzte replikative Lebensspanne auswirkt [40–42]. Über die Zeit akkumulieren sich diese Schäden in der Mutterzelle und können dadurch u.a. Apoptose auslösen [43]. Neben diesen Faktoren existieren weitere Mechanismen der Regulation des Alterns, wobei diese bspw. nährstoffsensitive Kinasen bzw. Signalwege (Tor, Ras/PKA, Sch9), Sirtuine, die retrograde Antwort und den Prozess der Kalorierestriktion beinhalten. Eine klare Abgrenzung von Prozessen die entweder replikatives oder chronologisches Altern regulieren ist größtenteils nicht möglich, da in beiden Fällen die Mechanismen überlappen und somit an der Regulation beider Alterungsparadigma beteiligt sind. Zwei regulatorische Faktoren können jedoch vermehrt der Regulation des replikativen Alterns assoziiert werden und werden nachfolgend kurz erläutert.

1.3.3.1 Sirtuine und rDNA

Die Sirtuine sind eine hochkonservierte Familie von NAD^+ -abhängigen Enzymen, welche eine Histondeacetylase- und ADP-Ribosyltransferaseaktivität aufweisen und in zahlreichen Organismen durch Homologe vertreten sind sowie zahlreiche regulative Funktionen erfüllen [44,45]. Die Beobachtung, dass eine Deletion von *SIR2* [engl.: silent information regulator; Histondeacetylase in *S. cerevisiae*] die Lebensspanne in Hefe um 50% verkürzt und eine Überexpression von *SIR2* eine Verlängerung der Lebensspanne von 30-40% bewirkte, ließ einen Einfluss von Sirtuinen auf die Regulation des Alterns vermuten [45]. Sir2p ist u.a. an der Unterbindung der Transkription am Mating-Lokus, an den Telomeren und der rDNA in *S. cerevisiae* beteiligt [46]. Ein bereits identifizierter Alterungsfaktor des replikativen Alterns sind die ERCs, welche durch homologe Rekombination innerhalb der rDNA entstehen. Das resultiert in Ausbildung selbstreplizierender zirkulärer DNA-Moleküle, welche aufgrund der asymmetrischen Teilung der Hefezellen in der Mutterzelle verbleiben [35]. Proteine, welche die rDNA-Rekombination und die Bildung von ERCs unterbinden, beeinflussen damit die replikative Lebensspanne. Bezüglich der Wirkung von Sir2p geht man allgemein davon aus, dass Sir2p die Ausbildung von ERCs durch Inhibierung der rDNA-Rekombination unterbindet. Ein weiteres Protein, welches die Ausbildung von ERCs fördert, wird durch *FOB1* codiert. Deletionen von *FOB1* sowie Überexpression von Sir2p resultieren daher in einer verlängerten replikativen Lebensspanne [35]. Die genaue Wirkung von ERCs in der Limitierung des Alters ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass die Replikations- bzw. Transkriptionsfaktoren, welche normalerweise an der rDNA arbeiten physikalisch mit den ERCs interagieren und somit nicht mehr zugänglich sind. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass ERCs generell die rDNA destabilisieren und damit eine Seneszenz auslösen [47]. Als Ursache für das Verbleiben der ERCs in der Mutterzelle wird eine Septin-abhängige Diffusionsbarriere diskutiert, welche den Transfer der Kernporen von Mutterzelle zu Tochterzelle inhibiert [48]. ERCs sind dabei mit der Kernpore assoziiert. Deletionen des Septinproteins Bud6p resultieren in einer symmetrischen Segregation der Kernporen und der ERCs [48]. Neben den ERCs werden zudem durch oxidativen Stress beschädigte Proteine sowie dysfunktionale Mitochondrien als replikative Alterungsfaktoren diskutiert, da diese ebenfalls in Folge der asymmetrischen Teilung in der Mutterzelle verbleiben [32]. Die Segregation

beschädigter Proteine wird über das Actinzytoskelett vermittelt und benötigt die Aktivität von Sir2p, welches nachträglich die Segregation von Antioxidanzenzymen wie bspw. der Katalase Ctt1p vermittelt [49]. Dysfunktionale Mitochondrien können zudem eine retrograde Antwort auslösen [engl.: retrograde response], die ebenfalls modulierend auf das replikative Altern wirkt. Eine weitere Funktion von Sir2p, welche im replikativen Altern wichtig ist, liegt in der Instandhaltung von telomerischem Heterochromatin. Es konnte gezeigt werden, dass die Verteilung von Sir2p an den Telomeren mit steigendem Zellalter abnimmt und dass der Verlust von Sir2p in einer steigenden Histonacetylierung an H4K16 und einem Verlust der Histone an subtelomeren Bereichen einhergeht, was nachträglich „im Kompromiss“ zum transkriptionellen Stillstand [engl.: silencing] führt [50]. Dadurch wird deutlich, dass hyperacetylierte Histone im Bereich der Telomere für die Regulation des replikativen Alterns wichtig sind.

1.3.3.2 Retrograde Antwort

Die retrograde Antwort zählt ebenfalls zu den Regulatoren des replikativen Alterns. Sie beschreibt einen Signalweg zwischen den Mitochondrien und dem Zellkern, der die Expression von metabolischen und stressspezifischen Genen in Abhängigkeit einer mitochondrialen Dysfunktion und deren Umfang reguliert [51]. Die Dysfunktionen umfassen hauptsächlich den teilweisen bzw. vollständigen Verlust der mitochondrialen DNA und dem damit verbundenen Verlust der Elektronentransportkettenfunktion [52]. Im Falle einer solchen Dysfunktion wird der Metabolismus auf eine alternative Kohlenstoffquelle zur Energiegewinnung umgestellt (Lipide, Acetat; Aktivierung des Glyoxalatzyklus), da die Aktivität des Citratzyklus durch die vorliegenden mitochondrialen Schäden nahezu stillgelegt ist [53]. Die Induktion der retrograden Antwort resultiert in einer verlängerten Lebensspanne von *S. cerevisiae* und wird durch die Gene *RTG1*, *RTG2* und *RTG3* gesteuert [53]. In diesem Zusammenhang ist *RTG2* besonders wichtig, da es als Bestandteil des SLIK-Komplexes (transkriptioneller Koaktivator-Komplex) zusammen mit *GCN5* und weiteren Faktoren die Chromatinremodellierung von Genen der retrograden Antwort beeinflusst und dadurch nachfolgend die Expression von Genen der retrograden Antwort begünstigt, welche wiederum für metabolische Enzyme und stressspezifische Proteine codieren [52]. Bei Deletionen von *RTG2* wird die retrograde Antwort

nicht aktiviert [54]. Die retrograde Antwort wird jedoch zusätzlich durch andere Stoffwechselwege, die allgemein an der Überwachung des biosynthetischen Status der Zelle beteiligt sind, beeinflusst. Das trifft bspw. für den Tor-Signalweg sowie den Ras-Signalweg zu [54, 55]. Die Aktivierung der retrograden Antwort wurde ebenfalls mit der erhöhten Akkumulation von ERCs in Verbindung gebracht [52]. In diesem Fall ist besonders die Rolle von *RTG2* hervorzuheben, da *RTG2* einerseits die retrograden Signale an *RTG1/RTG3* vermittelt, welche daraufhin eine Translokation vom Cytosol zum Zellkern erfahren, und andererseits als Suppressor der rDNA-Rekombination fungiert und damit der Akkumulation von ERCs entgegenwirkt [53]. Aus der bivalenten Funktion von *RTG2* lässt sich damit schlussfolgern, dass die Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit zwischen den Vor- und Nachteilen der Aktivierung der retrograden Antwort und der Repression der ERC-Akkumulation abwägen muss, um ihr weiteres Überleben zu sichern. Der generelle Auslöser der retrograden Antwort ist dennoch weiterhin ungeklärt. Es wird aber vermutet, dass es einen Zusammenhang zwischen dem F_1 -Teil der ATP-Synthase (ATPase) und *RTG2* gibt. Der F_1 -Teil der ATPase spielt bei der Erzeugung des $\Delta\Psi_m$ (inneres mitochondriales Membranpotential) eine wichtige Rolle. Da $\Delta\Psi_m$ während des replikativen Alterns abfällt, könnte es sein, dass Defekte im F_1 -Teil der ATPase bzw. der Abfall des $\Delta\Psi_m$ initiale Signale für *RTG2* darstellen, worauf dieses die retrograde Antwort aktiviert [52, 56].

1.3.4 Chronologisches Altern

Das chronologische Altern bzw. die chronologische Lebenspanne ist definiert als das Überleben in der stationären Phase, d.h. die Zeitspanne die post-mitotische Zellen überdauern bevor sie letztendlich absterben. Das chronologische Altern bzw. das Überdauern in der stationären Phase setzt verschiedene Adaptationen zur Aufrechterhaltung der zellulären Funktion in einer Umwelt, welche häufig durch eine geringe Nährstoffverfügbarkeit sowie erhöhten Stress geprägt ist, voraus.

1.3.4.1 Stressantwort im chronologischen Altern

Seitdem die Theorie der freien Radikale als Ursache des Alterungsprozesses erstmalig postuliert wurde [57], sind zahlreiche Studien zur zellulären Antwort auf oxidativen Stress entstanden. Die Theorie besagt, dass der Alterungsprozess durch erhöhte

zelluläre Schäden, aufgrund von ROS und deren Akkumulation hervorgerufen wird. ROS entstehen u.a. als Nebenprodukt der mitochondrialen Elektronentransportkette und können nachfolgend, bei unzureichender Versorgung mit ROS-abbauenden Enzymen (Katalasen, Peroxidasen, Superoxiddismutasen), zu diversen oxidativen Schäden an Proteinen und DNA führen.

Die ersten Gene, welche im Zusammenhang mit der Regulation des chronologischen Alterns identifiziert wurden, waren die für das Enzym Superoxiddismutase codierenden Gene *SOD1* und *SOD2* [58]. Die Überexpression dieser Gene resultierte in einer verlängerten chronologischen Lebensspanne (CLS); Deletionen verkürzten diese. Dadurch wurde deutlich, dass die Abwehr von ROS, bspw. des durch mitochondriale Respiration erzeugten Superoxid (O_2^-)-Radikals [59], bzw. allgemein die Antwort auf oxidativen Stress für ältere Zellen essentiell zum Überleben ist. Der erhöhte Bedarf an Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress korreliert dabei mit einer erhöhten Respirationsrate älterer Zellen [58]. Bezüglich der Aktivierung der Stressabwehrsysteme in älteren Zellen wurde besonders den nährstoffsensitiven Kinasen, wie bspw. Tor, Sch9 sowie der Ras/cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA), eine erhöhte Bedeutung zugesprochen. Diese drei Kinasen registrieren im Allgemeinen die Nährstoffverfügbarkeit in Hefen. Bei ausreichender Nährstoffverfügbarkeit vermitteln die Kinasen metabolische Aktivität, Zellwachstum, Zellteilung sowie die Regulation des Alterns sowie der Apoptose und unterbinden dabei gleichzeitig die Aktivierung von Stressabwehrsystemen [60–63]. Die Stressantwort wird u.a. über eine Relokalisierung der Transkriptionsfaktoren Msn2p/Msn4p eingeleitet [64]. Diese Faktoren aktivieren als Stressantwort verschiedene Gene (bspw. *CTT1*, *DDR2*, *HSP12*) über die Bindung an spezifische Promotorbereiche der Sequenz CCCCT, den sogenannten Stressantwortelementen [engl.: stress response elements (STRE)] [65]. Msn2p/Msn4p werden durch Rim15p kontrolliert, welches u.a. ein Zielprotein von Tor1p, PKA und Sch9p ist und in Hefe den Eintritt in die stationäre Phase reguliert [66]. Bei ausreichender Nährstoffverfügbarkeit sind Tor1p, PKA, Sch9p aktiv und unterbinden dabei die Translokation von Msn2p/Msn4p vom Cytosol zum Zellkern. Sobald die Nährstoffverfügbarkeit sinkt, reduziert sich die Aktivität der nährstoffsensitiven Kinasen und erlaubt somit die Translokation von Msn2p/Msn4p, wodurch die Stressabwehrmechanismen (bspw. *SOD* als Zielgen von Msn2p/Msn4p) und cytoprotektive Stoffwechselwege wie bspw. die Autophagie aktiviert werden [67,68]. Neben Msn2p/Msn4p sind noch weitere Transkriptionsfaktoren an der Initiierung

von Stressabwehrsystemen beteiligt. Als Beispiel sind dazu die Vertreter der *HAP* - Familie (*HAP2-5*) zu erwähnen, welche u.a. die Expression der Thioredoxinperoxidase 2 (*TSA2*) als Antwort auf oxidativen oder nitrosativen (Nitratoxid) Stress regulieren. Daneben können zusätzlich die Gene der *HOG* - Familie erwähnt werden, welche vor allem bei osmotischem Stress aktiv sind [69, 70]. Häufig kommt es in der zellulären Stressabwehr zu einer Überlagerung verschiedenster Abwehrsysteme, wobei die Transkriptionsfaktoren dabei ebenfalls parallel wirken.

1.3.4.2 Tor, Ras/cAMP-abhängige PKA, Sch9

Tor-Kinasen sind evolutionär hoch konservierte Proteine welche u.a. an der Regulation des Zellwachstums, der mRNA Translation (fördert die Produktion von Ribosomen) sowie der zellulären Stressantwort beteiligt sind [71, 72]. Für *S. cerevisiae* sind zwei Tor-Proteine beschrieben, welche den Aufbau von zwei Multiproteinkomplexe (TORC1/TORC2) ermöglichen: Tor1p und Tor2p [71]. TORC1 wird durch beide Tor-Proteine ausgebildet und ist somit bei einer Deletion eines der beiden Gene noch aktiv. TORC2 wird nur durch Tor2p gebildet, sodass $\Delta tor2$ - Mutanten generell nicht lebensfähig sind. Die Inaktivierung bzw. genetische Manipulation des Tor-Signalweges resultiert in einer erhöhten replikativen und chronologischen Lebensspanne. Der Mechanismus der Regulation des chronologischen Alterns ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass ein Zusammenhang zwischen dem Tor-Signalweg und der translationalen Regulation ribosomaler bzw. mitochondrialer mRNAs besteht [73, 74], wobei eine reduzierte Aktivität des Tor-Signalwegs dabei die Induktion der Respiration sowie die Aktivierung der mitochondrialen Genexpression zur Folge hat [75]. Studien von Deletionen in ribosomalen Proteinen sowie Translationsinitiationsfaktoren zeigten generell eine erhöhte Lebensspanne [76], wobei zusätzlich Deletionen in den von Tor1p regulierten ribosomalen Genen *RPL31A* und *RPL6B* ebenfalls eine verlängerte Lebensspanne zur Folge hatten [77].

Ein weiterer regulativer Signalweg ist der Ras/cAMP-abhängige PKA-Signalweg, welcher ebenfalls Wachstumssignale bzw. Zellteilungssignale aufgrund verfügbarer Nährstoffe vermittelt. Die Ras-Proteine von *S. cerevisiae*, Ras1p und Ras2p (kleine GTPasen), binden dabei direkt an die Adenylatzyklase Cyr1p und stimulieren dadurch die cAMP-Produktion. Die erhöhte cAMP-Produktion hat eine Aktivierung der PKA zur Folge, welche nachfolgend u.a. für die Zellteilung und das Zellwachstum

wichtig ist und als Repressor der Autophagie dient [78]. Die Autophagie ist ein ubiquitärer Prozess, welcher den lysosomalen Abbau zellulärer Komponenten wie bspw. fehlgefalteter, oxidativ beschädigter oder akkumulierter Proteine bzw. dysfunktionaler Mitochondrien vermittelt, da diese ansonsten den zellulären Stoffwechsel negativ beeinflussen. Sie wird zudem durch verminderte Tor-Aktivität begünstigt und wirkt sich dadurch positiv auf die Lebensspanne aus [79,80]. Eine Inaktivierung des PKA-Signalweges durch eine *RAS2* - Deletion resultiert in einer verlängerten chronologischen Lebensspanne, was durch die Msn2/4p vermittelte Stressantwort in der Expression von Hitzeschockproteinen, Superoxiddismutasen und Katalasen resultiert [60,67].

Sch9p ist ein Vertreter der AGC-Kinasefamilie und u.a. ein Zielprotein von TORC1 [81]. Sch9p ist ein negativer Regulator des replikativen und chronologischen Alterns und wurde ebenfalls als Regulator der mitochondrialen Atmung identifiziert [60,82]. In diesem Zusammenhang wurde demonstriert, dass eine Deletion von *SCH9* die Expression der mitochondrialen Elektronentransportketten erhöht. Eine Inhibierung der Atmung, der ATP-Synthese bzw. fehlende Komponenten der Elektronentransportkette resultieren allgemein in einer verkürzten Lebensspanne [60]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *SCH9* - Deletionen die Expression von Ethanol-abbauenden Enzymen (*ADH1-3*) induziert, was typisch für stationäre Zellen ist, da diese ihren Stoffwechsel aufgrund der geringen Nährstoffverfügbarkeit auf gluconeogenetische Bedingungen umstellen. Des Weiteren ist Sch9p in der Lage die Aktivität der PKA zu inhibieren [83].

Auch wenn einige der Funktionen von Tor-, Ras/cAMP-abhängiger PKA- und Sch9-Kinasen durchaus voneinander separierte Ziele im Zellstoffwechsel haben, lässt sich erkennen, dass die drei Signalwege zusammen auf ähnliche Weise Einfluss auf spezifische, besonders bei älteren Zellen auftretende, Phänotypen nehmen und dabei teilweise gegenseitig regulativ wirken [84]. Die Kinasen registrieren die Nährstoffverfügbarkeit (Kohlenhydrate, Stickstoffquellen) und regulieren dabei, in Abhängigkeit von der Umwelt, die zelluläre Adaptation, wobei unter Nährstoffmangelbedingungen die Aktivität der Kinasen reduziert wird. Diese reduzierte Aktivität manifestiert sich daraufhin in verminderter Zellwachstums- und Teilungsrate sowie der Ausbildung von Stressabwehrsystem, Autophagie und der Verschiebung des Stoffwechsels von primär fermentativen hin zum respirativen, gluconeogenetischen Stoffwechsel.

1.3.4.3 Kalorierestriktion

Kalorierestriktion [engl.: caloric restriction (CR)] beschreibt eine natürliche, nicht genetisch verursachte, Maßnahme zur Verlängerung der Lebensspanne. Dabei wird die Nährstoffverfügbarkeit reduziert, in dem bspw. die Glucosekonzentration im Wachstumsmedium von 2% auf 0.5% oder 0.05% gesenkt wird [85]. Neben Kohlenhydraten treten auch für Aminosäuren, bei reduzierter Verfügbarkeit, positive Effekte bezüglich der Lebensspanne auf [86]. Man geht davon aus, dass die Effekte der CR bezüglich des chronologischen Alters ebenfalls über die nährstoffsensitiven Kinasen (Tor, PKA, Sch9) vermittelt werden, da die zellulären Anpassungen (Stressresistenz, Verschiebung des Stoffwechsel zu Respiration) analog zu den Effekten der Kinasemodulationen sind. Das replikative Altern kann ebenfalls durch CR reguliert werden, wobei in diesem Fall davon ausgegangen wird, dass die Effekte der CR primär über Sir2p vermittelt werden und dass dabei die zellulären NAD^+ - Level entscheidend sind [86].

1.3.5 Kohlenstoffmetabolismus bei *S. cerevisiae*

Die Hefe *S. cerevisiae* ist in der Lage ihr Wachstum, ihren Metabolismus und ihre Genexpression in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Kohlenstoffquelle zu regulieren. Sobald Glucose, die primär genutzte Energiequelle bei Hefen, in ausreichender Menge zur Verfügung steht, wird die Expression von glykolytischen Genen, Glucosetransportern und ribosomalen Proteinen induziert, welche die Aufnahme und die Umsetzung von Glucose garantieren. Die Aufnahme von Glucose wird in Hefen hauptsächlich über Glucosetransporter der Hexosetransporterfamilie vermittelt, welche durch 20 Gene codiert ist. Die Haupttransportproteine werden dabei durch sechs Gene (*HXT1-4*, *HXT6-7*) codiert [87]. Die Glucosekonzentration wird über die Gene *SNF3* und *RTG2* registriert und die Expression der Hexosetransporter über *RTG* (transkriptioneller Glucoserepressor) reguliert [88]. Die Glucoseinduktion der *HXT* - Gene wird durch Inhibierung von Rtg1p erreicht und benötigt zusätzlich die Aktivität von Grr1p [89]. Neben Rtg1p werden einige *HXT* - Gene zusätzlich durch Mig1p reprimiert [90]. Als zentraler Regulator der glykolytischen Genexpression wird Gcr1p vermutet, welcher an das, für glykolytische Gene hochkonservierte und charakteristische CTTCC-Motiv bindet und dieses positiv reguliert [91]. Daneben scheinen weitere Transkriptionsfaktoren wie bspw. Rap1p, Reb1p, Abf1p die Expression zahl-

reicher glykolytischer Gene zu beeinflussen [92]. Gleichzeitig verursacht Glucose eine Repression anderer Gene, welche bei der Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen von Bedeutung sind [93]. So reprimiert Glucose u.a. Gene der Gluconeogenese, des Citratzyklus, der Respiration und der Peroxisomen. Die reprimierende Wirkung von Glucose wird allgemein als Katabolit- bzw. Glucoserepression bezeichnet (GCR). Die Effekte der Glucoserepression manifestieren sich u.a auf transkriptioneller Ebene und vermitteln dabei vermutlich Signale zur mRNA Degradation, einer veränderten Translation bzw. Signale zum Abbau von Proteinen, welche für die Nutzung alternativer Kohlenstoffquellen notwendig wären. D.h. Glucose interferiert entweder mit Aktivatoren der Transkription oder stimuliert die Aktivität von Proteinen, welche negative Effekte auf die Transkription haben. Die reprimierende Wirkung wird dabei hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren Tup1p, Ssn6p und Mig1p vermittelt [94]. Für die Inhibierung der Glucoserepression ist die Funktion des Snf1-Proteinkinasewegs von zentraler Bedeutung, welche die Glucoserepression über das Mig1p-DNA-bindende Repressorprotein steuert [90]. Die Snf1-Kinase wird unter Glucosemangelbedingungen durch Phosphorylierung aktiviert und durch Reg1p inhibiert [90]. In ihrer Wirkung verursacht Snf1p die Inhibierung von Mig1p (Repressor) und erlaubt dadurch die Transkription zuvor reprimierter Gene. Desweiteren ist Snf1p in der Lage transkriptionelle Aktivatoren wie bspw. Gal4p, Sip1p und Cat8p zu stimulieren, wobei diese u.a. die Expression von Genen der Gluconeogenese induzieren bzw. für die Umstellung des Stoffwechsels während der diauxischen Verlagerung [engl.: diauxic shift; Umstellung des Stoffwechsels von Fermentation auf Respiration/Gluconeogenese bei Glucoselimitierung] verantwortlich sind [90, 95, 96]. Nach Aufhebung der Glucoserepression können weitere Kohlenstoffquellen wie bspw. Galactose und Ethanol metabolisiert werden.

Der Galactosemetabolismus wird u.a. durch *GAL4* gesteuert. Gal4p aktiviert die Transkription von spezifischen Genen der *GAL* - Familie, welche für Enzyme des Galactosekatabolismus codieren [93]. Die *GAL* - Gene werden durch Glucose über Mig1p reprimiert [97]. Die Galactoseaufnahme wird in der Regel durch Gal2p, ein hoch-affiner Galactosetransporter, vermittelt [98]. Nachfolgend werden die für den Galactosemetabolismus notwendigen Bestandteile des Respirationssystems (Citratzyklus, Atmungskette) durch die Transkriptionsfaktoren Gcr1p, Hap2p, Hap3p, Hap5p, Rtg1p und Rtg2p induziert [94].

Der Metabolismus von nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie bspw. Ethanol oder Acetat wird hauptsächlich durch die Transkriptionsfaktoren Cat8p und Sip4p kontrolliert (in Abhängigkeit von Snf1p), welche die Expression von Enzymen der Gluconeogenese vermitteln und in Kombination mit den Hap-Transkriptionsfaktoren ebenfalls die Expression von Genen der mitochondrialen Atmungskette stimulieren [94]. Zusätzlich werden die Gene des Glyoxalatzyklus aktiviert (Cat8p, Sip4p, Rds2p) [3], der als Hauptassimilationsweg für C₂-Körper dient. Der Import von Ethanol erfordert keinen aktiven Transport und erfolgt spontan durch Diffusion. Ethanol wird nachfolgend über Alkohol- bzw. Aldehyddehydrogenasen zu Acetaldehyd (über *ADH2*) oder Acetat (über *ALD6*) umgesetzt und später in Form von Acetyl-CoA dem Glyoxalat- bzw. Citratzyklus zugeführt.

Neben diesen transkriptionellen Programmen, welche primär die Aufnahme und Umsetzung der jeweiligen Kohlenstoffquelle gewährleisten, ergeben sich für die Kontrolle des Metabolismus nachfolgend weitere Regulationsmöglichkeiten über post-transkriptionelle Modifikationen (z.B. Phosphorylierung), Autoregulationsmechanismen (Substrat-/Endprodukthemmung oder allosterische Modifikationen) sowie durch zahlreiche Signalwege, welche dadurch eine schnelle Adaptation des Metabolismus an unterschiedliche Bedingungen ermöglichen [99–101].

1.4 Systematische Studien des Metabolismus

Die Entwicklung diverser analytischer, experimenteller und software-basierter Methoden hat dazu beigetragen das bisherige Verständnis des Metabolismus und dessen Regulation stark zu erweitern. Hochdurchsatzmethoden wie bspw. Next-Generation-Sequencing (NGS) oder DNA-Microarrays sowie die zahlreichen „Omics“-Anwendungen (bspw. Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics etc.) haben es ermöglicht, die verschiedenen zellulären Regulationsebenen (Genom, Transkriptom, Proteom, Metabolom, Fluxom) durch die Generierung enormer Datensätze miteinander zu verbinden. Trotz des großen Fortschritts im Bereich der analytischen Methoden besteht jedoch weiterhin eine Limitierung in der Interpretation solcher Datensätze. Die Probleme resultieren aus der Tatsache, dass es für die Zelle eine Vielzahl von Möglichkeiten gibt, regulativ auf die verschiedenen Ebenen einzuwirken. Weiterhin sind die Intermediate des Stoffwechsels, welche gleichzeitig an verschiede-

nen Reaktionen beteiligt sind (bspw. ATP, NADH, Glutamat) schwer einzuordnen, da sie keine spezifischen Ziel- und Wirkungsorte haben. Dennoch erlauben es die zahlreichen Methoden sich einen ersten Einblick in die Mechanismen der Zelle unter wechselnden Umweltbedingungen zu verschaffen. Bezüglich der Umweltbedingung kann dabei zwischen externen und internen Modifikationen unterschieden werden. Die externen Modifikationen, bspw. simuliert durch veränderte Nährstoffzufuhr oder den Kontakt mit toxischen, osmotischen u.a. stressauslösenden Substanzen, können nachfolgend intrazelluläre Adaptationen auslösen, welche eventuell eine bzw. mehrere regulatorische Ebenen der Zelle beeinflussen. Intrazellulär können Perturbationen durch genetische Mutationen bzw. Deletionen verursacht werden. Erste Studien zeigten bereits, dass sich milde Perturbationen im Enzymlevel von Stoffwechsellzymen direkt auf die Metabolitenverteilung auswirken können [102]. Kombinationen von genetischen und umweltbedingten Perturbation auf metabolischer Ebene zeigten zudem, dass umweltbedingte Störungen einen globaleren Effekt auf die Verteilung der Metaboliten haben als Deletionen einzelner Stoffwechsellzyme. Diese verursachten zumeist nur lokale Konzentrationsänderungen der Metaboliten in topologischer Nähe ihrer katalysierten Reaktion bzw. entsprechend ihrer Position im Stoffwechselweg [103].

In diesem Zusammenhang ist bisher weiterhin ungeklärt, ob sich diese Störungen generell als robuste Phänotypen etablieren und damit potentiell von diagnostischem bzw. biotechnologischem Wert sind. Bislang sind keine systematischen Studien zum Effekt von genetischen und umweltbedingten Störungen auf Ebene der Aminosäuren bekannt. Da Aminosäuren primär ausgehend von Vorläufern des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels synthetisiert werden, könnte eine systematische Analyse von Mutanten des Kohlenhydratstoffwechsels ein erster Schritt zum Verständnis der regulativen Zusammenhänge dieser beiden Ebenen sein.

1.5 Zielsetzung

Das Verständnis der molekularen Grundlagen und der biochemischen Interaktionen im Zusammenhang mit der Regulation des Alterungsprozesses ist bis heute von großem Interesse. Durch zahlreiche Studien konnte bereits eine große Anzahl von Genen identifiziert werden, welche an der Modulation und Regulation der Lebensspanne von *S. cerevisiae* beteiligt sind. Für eine Vielzahl der bereits identifizierten Gene besteht jedoch weiterhin die Frage, auf welcher mechanistischen Grundlage bzw. durch welche regulativen biochemischen Prinzipien sie zu einer Modulation der Lebensspanne beitragen. Um der Lösung dieser Frage näher zu kommen sollen im ersten Teil der vorliegenden Dissertation Gene, welche zuvor bereits mit der Modulation der chronologischen Lebensspanne bei *S. cerevisiae* assoziiert wurden, auf mögliche bestehende genetische Interaktionen untersucht werden. Dazu soll ausgehend von den 90 langlebigsten Deletionsmutanten aus der Studie von Powers *et al.* [104] eine Doppeldeletionsbank erstellt werden, um nachfolgend mittels eines kompetitiven Haploprofizienzscreens diejenigen Mutanten bzw. Gene zu identifizieren, welche durch ihre genetische Interaktion vorteilhaft für das Überleben unter Wettbewerbsbedingungen sind. Die auf diese Weise angereicherten Mutanten sollen nachfolgend biochemisch charakterisiert werden, um deren adaptive Mechanismen, welche sich im Wettbewerbsexperiment als Überlebensvorteil ausprägten, zu identifizieren.

Im zweiten Teil der Dissertation soll die Frage erörtert werden, inwiefern sich Kombinationen aus umweltbedingten (Verwendung alternativer Kohlenstoffquellen) und systematischen, genetischen Störungen zweier zentraler Kohlenhydratstoffwechselwege (Glycolyse/Pentosephosphatweg) auf die regulative Ebene der Aminosäuren auswirken. Dazu sollen einerseits die Wachstumsprofile der Stoffwechselmutanten in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Kohlenstoffquelle (Glucose, Galactose, Ethanol) aufgenommen werden und andererseits mittels Massenspektrometrie die Verteilung der intrazellulären Aminosäuren innerhalb der Mutanten bestimmt werden. Dies soll aufzeigen, inwiefern die Stoffwechselmutanten den zellulären Pool an freien Aminosäuren beeinflussen. Dadurch könnten potentiell regulatorische Zusammenhänge einzelner Stoffwechsellzyme auf die Gesamtverteilung der Aminosäuren aufgedeckt werden. Ein weiteres Ziel besteht darin, aufzuzeigen welche Aminosäuren am stärksten in ihrer Konzentration durch Deletionen in den beiden Stoffwechselwegen beeinflusst werden und welche Mutanten generell die stärksten Auswirkungen

auf die Ebene der Aminosäuren zeigen. Weiterhin ist es durch die parallele Analyse der Aminosäureprofile unter verschiedenen Umweltbedingungen in Kombination mit genetischen Perturbationen möglich, eventuell bestehende Korrelationen einzelner Aminosäuren zu identifizieren und daraufhin deren Dynamik unter den drei Kohlenstoffquellen zu demonstrieren.

2 Material

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Geräte/Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
96-Well Platten	655101	greiner bio-one
AB SCIEX QTRAP 5500	-	AB SCIEX
ABI-prism 384-Well Platte	4343814	Applied Biosystems
Agilent 1290 Infinity LC	-	Agilent
Agilent 6460 Triple Quad MS	-	Agilent
AxioCam MR	-	Zeiss
Dialyse-Membran (0.025 μ m)	VSWP01300	Millipore
Dialyse-Membran (0.45 μ m)	HAWP02500	Millipore
Elektrophoresekammer	-	Eigenbau (MPIMG)
Erlenmeyerkolben, enghals, 10ml	-	Intern (MPIMG)
Erlenmeyerkolben, enghals, 50ml	-	Intern (MPIMG)
Erlenmeyerkolben, enghals, 100ml	-	Intern (MPIMG)
Erlenmeyerkolben, enghals, 500ml	-	Intern (MPIMG)
FastPrep-24	-	MP Biomedicals
Glaskugeln (425-600 μ m)	G8772-100G	Sigma Aldrich
Glaskugeln (Ausplattierhilfe)	-	Intern (MPIMG)
Handschuh (nitril)	XC-INT-L	Microflex XCEED
Impfösen (1 μ l)	6129352	VWR
Inkubator (Brutschrank) B6200	-	Heraeus
Kryo-Röhrchen (2ml)	121263	greiner bio-one
Kühlschrank	-	Bosch / Siemens
Kulturröhrchen (14ml)	187261	greiner bio-one
Kulturröhrchen (15ml)	62.554.502	Sarstedt
Kulturröhrchen (50ml)	227261	greiner bio-one
Küvetten	Y195.1	Roth
Laborflaschen 50-1000ml	-	MedChrom
Lagergestell für 1.5-2ml Röhrchen	E2380-5008	Starlab
Lagergestell für 15ml / 50ml Röhrchen	E2396-9721	Starlab
Lagergestell für 15ml Röhrchen	E2396-1515	Starlab
Magnetrührer	-	Heidolph
Mikrowelle	-	Privileg
Nanodrop ND 2000	-	Thermo Scientific
Netzteil	55-EV231	peqlab
Parafilm (M)	PM-996	Bemis

2 Material

PCR Maschine PTC-100	-	MJ Research Inc.
Petrischalen	632171	greiner bio-one
pH-Indikatorstreifen (pH 0-14)	37026	Fluka
Photometer Ultraspec 3100 Pro	-	Amersham
Pipette 8-Kanal (elektronisch) 50-1250 μ l	4861000821	Eppendorf
Pipette Einkanal (variabel) 0.1-2.5 μ l	3120000011	Eppendorf
Pipette Einkanal (variabel) 0.5-10 μ l	3120000020	Eppendorf
Pipette Einkanal (variabel) 2-20 μ l	3120000038	Eppendorf
Pipette Einkanal (variabel) 10-100 μ l	3120000046	Eppendorf
Pipette Einkanal (variabel) 20-200 μ l	3120000054	Eppendorf
Pipette Einkanal (variabel) 100-1000 μ l	3120000062	Eppendorf
Pipette Einkanal (variabel) 0.5-5ml	3120000070	Eppendorf
Pipettenspitzen (10 μ l)	F171100	Gilson
Pipettenspitzen (5ml)	F161571	Gilson
Pipettenspitzen (0.1-10 μ l, gestopft)	692139	Biozym
Pipettenspitzen (2-20 μ l, gestopft)	692151	Biozym
Pipettenspitzen (20-200 μ l, gestopft)	692069	Biozym
Pipettenspitzen (50-1250 μ l)	022492063	Eppendorf
Reaktionsgefäß (SafeLock, 2ml)	0030120.094	Eppendorf
Reaktionsgefäß (PCR-Stripe, 0.2ml)	710990	Biozym
Reaktionsgefäß (Schraubdeckel, 2ml)	72.694	Sarstedt
Reaktionsgefäß (Schraubdeckel, 1.5ml)	72.706	Sarstedt
Reaktionsgefäß (0.5ml)	72.699	Sarstedt
Reservoir Regent (50ml)	4870	Costar
Rotator	2-1175	NeoLab
Schüttelinkubator (Innova 44)	-	New Brunswick
Skalpelle (Einweg)	5518091	B Braun
SpeedVac	-	-
Sterilbank HPH 18	-	Heraeus
Sterilfilter (0.22 μ m)	431118	Corning
Thermomixer comfort (0.5-2ml)	-	Eppendorf
Thermomixer PST-60 HL plus	-	lab 4 you
Tischzentrifuge 5415 D	022621408	Eppendorf
Ultrazentrifuge 5810R	-	Eppendorf
UV - Illuminator	-	Alpha Innotech
Vortex Genie 2	SI-0256	Scientific Industries
Waage LC2200	-	Sartorius
Wasserbad SUB 28	-	Grant
Zahnstocher	-	-

2.2 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
1,4-Piperazinediethansulfonsäure (Pipes)	P6757	Sigma-Aldrich
2-Propanol	109634	Merck
Acetonitril	100665	Merck
Adeninhemisulfat	A9126	Sigma-Aldrich
Agarose	840004	Biozym
Ammoniumsulfat	101217	Merck
Ampicillin - Natriumsalz	A9518	Sigma-Aldrich
BactoTM - Agar	214030	Difko
BactoTM - Hefeextrakt	212750	BD Biosciences
BactoTM - Pepton	211677	BD Biosciences
Betain	61962	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	102391	Merck
Chloroform	611778	Sigma-Aldrich
CSM - Ade-His-Leu-Trp-Ura	841085100	Krackeler Scientific
Cumolhydroperoxid	513296	Sigma-Aldrich
D-Sorbitol	S1876	Sigma-Aldrich
D-(+)-Galactose	G0750	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glucosemonohydrat	4074	Merck
Diamid	D3648	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	105104	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	D8418	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	D9779	Sigma-Aldrich
dNTP mix (200 μ mol)	39029	Bioline
Essigsäure	1000622500	Merck
Ethanol	111727	Merck
Ethidumbromid (EtBr)	7870	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	108454	Merck
G418-Disulfat (Geneticin)	A1720	Sigma-Aldrich
Gel Loading Dye (6x)	B7021 S	NEB
Glycerol	104092	Merck
Hygromycin B	A5347	Applichem
Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphtoquinon)	H47003	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat	104820	Merck
Kaliumchlorid	104936	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	104873	Merck
L-Gluthation (oxidiert)	150568	Sigma-Aldrich
L-Gluthation (reduziert)	G4251	Sigma-Aldrich
LB-Agar	113002222	MP Biomedicals
L-Histidin	H8000	Sigma-Aldrich
Lithiumacetatdihydrat	L6883	Sigma-Aldrich
L-Leucin	L8000	Sigma-Aldrich
L-Tryptophan	T0254	Sigma-Aldrich
Magnesiumchloridhexahydrat	105833	Merck
Magnesiumsulfatheptahydrat	105886	Merck
Mangan-(II)-chloridtetrahydrat	105927	Merck
Menadion	M5625	Sigma-Aldrich

2 Material

Methansäure	1002642500	Merck
N-Acetyl-L-Cystein	A7250	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	3957	Carl Roth
Natriumcitrat	HN13	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat	0183	Carl Roth
Natriumhydroxid	6771	Carl Roth
Nourseothricin	AB-101L	Jena Bioscience
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	202444	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	A2153	Sigma-Aldrich
RNase Away	21402178	MBP
Salzsäure	109057	Merck
Sucrose	84097	Sigma-Aldrich
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	19997	Sigma-Aldrich
tris(Hydroxymethyl)-aminomethan	648311	Merck
Triton X-100	X100	Sigma-Aldrich
Uracil	U0750	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid-Lsg. 30% (w/w)	H1009	Sigma-Aldrich
Yeast nitrogen base	Y0626	Sigma-Aldrich

New England Biolabs (NEB), Molecular Bioproducts (MBP).

2.3 Kits

Tabelle 4: Kits

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
DNA Clean & Concentrator TM -5	D4003	Zymo Research
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	27106	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit (250)	28706	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit (250)	28104	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit (50)	11635379001	Roche
RNase-Free DNase Set (50)	79254	Qiagen
RNeasy Mini Kit (50)	74104	Qiagen
Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit	D4001	Zymo Research

2.4 Organismen

Tabelle 5: Bakterien

Bezeichnung	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>flvA2</i> , Δ (<i>argF-lacZ</i>) <i>U169</i> , <i>phoA</i> , <i>glnV44</i> , ϕ 80, Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i> , <i>gyrA96</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i>

Sämtliche, in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme sind Abkömmlinge des parental Hefestamms S288C [105]. Die Wildtypstämme, so wie alle nachfolgend aufgeführten Deletionsmutanten, entstammen der Internationalen Knock Out - Sammlung und wurden über EUROSCARF (Frankfurt, Deutschland) bezogen [106].

Tabelle 6: Hefen

Bezeichnung	Genotyp
BY4741	MAT a, <i>his3-1</i> , <i>leu2</i> Δ 0, <i>met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0
BY4742	MAT α , <i>his3-1</i> , <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0
BY4743	MAT a/ α , <i>his3-1/his3-1</i> , <i>leu2</i> Δ 0/ <i>leu2</i> Δ 0, <i>lys2</i> Δ 0/ <i>LYS2</i> , <i>MET15/met15</i> Δ 0, <i>ura3</i> Δ 0/ <i>ura3</i> Δ 0

Folgende *S. cerevisiae* - Deletionsmutanten wurden innerhalb der vorliegenden Dissertation verwendet:

Tabelle 7: Systematische Nomenklatur für Hefemutanten

Y	Hefe (Yeast)
H	Chromosom Nr. VIII
R/L	rechter/linker Arm (right/left)
195	chromosomale Position
W/C	codiert von Watson-Strang (3'-5')
	codiert von Crick-Strang (5'-3')

2 Material

Tabelle 8: Hefemutanten für die heterozygote Mutantenbank

MAT a		MAT α	
Δ YBL042C	Δ YHR209W	Δ YBL042C	Δ YHR142W
Δ YBL102W	Δ YIL056W	Δ YBL102W	Δ YHR158C
Δ YBL103C	Δ YIL094C	Δ YBL103C	Δ YHR167W
Δ YBR019C	Δ YIL156W	Δ YBR019C	Δ YHR195W
Δ YBR030W	Δ YJL129C	Δ YBR030W	Δ YHR204W
Δ YBR077C	Δ YJL165C	Δ YBR077C	Δ YHR209W
Δ YBR248C	Δ YJR066W	Δ YBR248C	Δ YIL056W
Δ YCL025C	Δ YKL001C	Δ YCL025C	Δ YIL094C
Δ YCR037C	Δ YKL015W	Δ YCR037C	Δ YIL156W
Δ YDR019C	Δ YKL027W	Δ YDL172C	Δ YJL165C
Δ YDR221W	Δ YKL046C	Δ YDL173W	Δ YJR066W
Δ YDR262W	Δ YKL068W	Δ YDR019C	Δ YKL001C
Δ YDR490C	Δ YKL081W	Δ YDR221W	Δ YKL015W
Δ YDR515W	Δ YKL175W	Δ YDR262W	Δ YKL027W
Δ YEL014C	Δ YKL216W	Δ YEL014C	Δ YKL046C
Δ YER040W	Δ YKR007W	Δ YER040W	Δ YKL068W
Δ YER091C-A	Δ YKR034W	Δ YER091C-A	Δ YKL081W
Δ YER132C	Δ YKR095W	Δ YER132C	Δ YKL175W
Δ YFR041C	Δ YLL007C	Δ YFR041C	Δ YKR007W
Δ YGL033W	Δ YLL013C	Δ YGL033W	Δ YKR034W
Δ YGL083W	Δ YLR152C	Δ YGL083W	Δ YKR095W
Δ YGL139W	Δ YLR428C	Δ YGL139W	Δ YLL007C
Δ YGL195W	Δ YLR455W	Δ YGL195W	Δ YLL013C
Δ YGL197W	Δ YML066C	Δ YGL197W	Δ YLR152C
Δ YGL203C	Δ YML121W	Δ YGL203C	Δ YLR428C
Δ YGR027C	Δ YNL014W	Δ YGR027C	Δ YLR455W
Δ YGR043C	Δ YNL016W	Δ YGR043C	Δ YML066C
Δ YGR044C	Δ YNL021W	Δ YGR044C	Δ YML121W
Δ YGR045C	Δ YNL142W	Δ YGR045C	Δ YNL014W
Δ YGR057C	Δ YOL116W	Δ YGR054W	Δ YNL016W
Δ YGR153W	Δ YOR179C	Δ YGR057C	Δ YNL021W
Δ YGR163W	Δ YPL042C	Δ YGR059W	Δ YNL142W
Δ YHL034C	Δ YPL133C	Δ YGR153W	Δ YOL116W
Δ YHR003C	Δ YPL182C	Δ YGR163W	Δ YOR179C
Δ YHR111W	Δ YPR021C	Δ YGR237C	Δ YPL042C
Δ YHR124W	Δ YPR031W	Δ YGR289C	Δ YPL133C
Δ YHR125W	Δ YPR138C	Δ YHL034C	Δ YPL182C
Δ YHR126C	Δ YPR158W	Δ YHR003C	Δ YPR021C
Δ YHR139C	Δ YHR064C	Δ YPR031W	
Δ YHR142W	Δ YHR111W	Δ YPR138C	
Δ YHR158C	Δ YHR124W	Δ YPR158W	
Δ YHR167W	Δ YHR125W		
Δ YHR195W	Δ YHR126C		
Δ YHR204W	Δ YHR139C		

Zur Bestimmung der Wachstumsraten und der Aminosäureverteilungsprofile von Glycolyse-/PPP-Mutanten wurden folgende Stämme verwendet und zuvor durch Transformation mit dem Plasmid pHLUM [107] prototroph gemacht.

Tabelle 9: Glycolyse-/PPP-Mutanten

Glycolyse		PPP	
Genname	Gen - ID	Genname	Gen - ID
$\Delta eno1$	$\Delta YGR254W$	$\Delta tkl1$	$\Delta YPR074C$
$\Delta fbp1$	$\Delta YLR377C$	$\Delta tkl2$	$\Delta YBR117C$
$\Delta glk1$	$\Delta YCL040W$	$\Delta zwf1$	$\Delta YNL241C$
$\Delta gpm2$	$\Delta YDL021W$	$\Delta gnd1$	$\Delta YHR183W$
$\Delta gpm3$	$\Delta YOL056W$	$\Delta gnd2$	$\Delta YGR256W$
$\Delta h\alpha k1$	$\Delta YFR053C$	$\Delta rbk1$	$\Delta YCR036W$
$\Delta h\alpha k2$	$\Delta YGL253W$	$\Delta rpe1$	$\Delta YJL121C$
$\Delta pck1$	$\Delta YKR097W$	$\Delta shb17$	$\Delta YKR043C$
$\Delta pfk1$	$\Delta YGR240C$	$\Delta sol1$	$\Delta YNR034W$
$\Delta pfk26$	$\Delta YIL107C$	$\Delta sol2$	$\Delta YCR073W-A$
$\Delta pfk27$	$\Delta YOL136C$	$\Delta sol3$	$\Delta YHR163W$
$\Delta pgm1$	$\Delta YKL127W$	$\Delta sol4$	$\Delta YGR248W$
$\Delta pgm2$	$\Delta YMR105C$	$\Delta tal1$	$\Delta YLR354C$
$\Delta pgm3$	$\Delta YMR278W$	$\Delta nqm1$	$\Delta YGR043C$
$\Delta pyc1$	$\Delta YGL062W$	$\Delta prs2$	$\Delta YER099C$
$\Delta pyc2$	$\Delta YBR218C$	$\Delta prs3$	$\Delta YHL011C$
$\Delta pyk2$	$\Delta YOR347C$	$\Delta prs4$	$\Delta YBL068W$
$\Delta tdh1$	$\Delta YJL052W$	$\Delta prs5$	$\Delta YOL061W$
$\Delta tdh2$	$\Delta YJR009C$		
$\Delta tdh3$	$\Delta YGR192C$		

2.5 Nährmedien

Tabelle 10: Nährmedien für *E. coli*

Name	Zusammensetzung
LB	L-Broth 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
LB-Agar	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl 15 g/l Agar

Tabelle 11: Nährmedien für *S. cerevisiae*

Name	Zusammensetzung
YPD	20 g/l Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Glucose
YPD-Agar	20 g/l Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Glucose 20 g/l Agar
SC	20 g/l Glucose 6.78 g/l YNB 0.59 g/l CSM 0.01 g/l Adenin 0.02 g/l Uracil 0.02 g/l Histidin 0.06 g/l Leucin 0.04 g/l Tryptophan
SC-Agar	20 g/l Agar + SC
SM	20 g/l Glucose 6.78 g/l YNB
SM-Agar	20 g/l Agar + SM
SC oder SM-Glucose	20 g/l Glucose
SC oder SM-Galactose	20 g/l Galactose
SC oder SM-Ethanol	3% Ethanol abs. + 0.1% Glucose
SC oder SM-Glycerol	3% Glycerol + 0.1% Glucose

YNB	5 g/l Ammoniumsulfat 2 µg/l Biotin 400 µg/l Calciumpentothentat 2 µg/l Folsäure 2 mg/l Inositol 400 µg/l Nikotinsäure 200 µg/l p-Aminobenzoensäure 400 µg/l Pyridoxin HCl 200 µg/l Riboflavin 400 µg/l Thiamin HCl 0.1 g/l Citronensäure 500 µg/l Borsäure 40 µg/l Kupfersulfat 100 µg/l Kaliumiodid 200 µg/l Eisen(III)-chlorid 400 µg/l Magnesiumchlorid 200 µg/l Natriummolybdat 400 µg/l Zinksulfat 1 g/l Kaliumphosphat 0.1 g/l Natriumchlorid 0.1 g/l Calciumchlorid
CSM - Ade-Leu-Ura-His-Trp	50 mg/l L-Arginin HCl 80 mg/l L-Asparaginsäure 50 mg/l L-Isoleucin 50 mg/l L-Lysin HCl 20 mg/l L-Methionin 50 mg/l L-Phenylalanin 100 mg/l L-Threonin 50 mg/l L-Tyrosin 140 mg/l L-Valin

2.6 Antibiotika

Tabelle 12: Antibiotika

Name	Zusammensetzung
Ampicillin	100 µg/ml
G ₄₁₈ - Sulfat	250-800 µg/ml

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 13: Puffer/Lösungen

Name	Zusammensetzung
Lyse-Puffer	2% Triton X-100 1% SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA (pH 8.0)
TAE-Puffer	40 mM Tris-Base 20 mM CH ₃ COOH 1 mM EDTA (pH 8.0)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 1 mM EDTA (pH 8.0)
TB-Puffer	10 mM CaCl ₂ 10 mM PIPES-NaOH 15 mM KCl 55 mM MnCl ₂
Taq.-Polymerase-Puffer	650 mM Tris-Cl (pH 8.8) 166 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 31 mM MgCl ₂ 0.1% (v/v) Tween-20
CES	0.54 M Betain 1.34 mM DTT 1.34% DMSO 11 µg/ml BSA
Hefe-Transformationsmix	60% (w/v) PEG 3350 50 mM LiAc 50 mg/ml Träger-DNA (Lachs)
Laufpuffer (Elektrophorese)	400 g/l Sucrose 2.5 µg/l Bromphenolblau
dNTP-Mix	25 mM dATP 25 mM dTTP 25 mM dGTP 25 mM dCTP

2.8 Primer

Tabelle 14: Primer

Name	5' - 3' Sequenz	Verwendung
<i>kanMX4::LEU2</i> -fwd	GCTGCAGGTCGACGG ATCCCCGGGTTAATT AAGGCGCGCCAGATC AACTGTGGGAATACT CAGGT	Austausch von genomischer <i>kanMX4</i> -Kassette mit <i>LEU2</i> (aus pACT2)
<i>kanMX4::LEU2</i> -rev	TTTATTGTCAGTACT GATTAGAAAACTCA TCGAGCATCAAATGA TCATGATTTTCTGTT ACACC	Austausch von genomischer <i>kanMX4</i> -Kassette mit <i>LEU2</i> (aus pACT2)
<i>LEU2</i> -fwd	AGGTGTAACAGAAAA TCATGAT	Amplifizierung des Downtags in Doppelmutanten (bindet im <i>LEU2</i> -Lokus)
pFA6-fwd	CTCGACATCATCTGC CCAGA	Sequenzierungsprimer für Downtag (bindet in <i>kanMX4</i> -Kassette)
pFA6-rev	GTCTGCAGCGAGGAG CCGTA	Sequenzierungsprimer für Uptag (bindet in <i>kanMX4</i> -Kassette)
Uptag	GATGTCCACGAGGTC TCT	Amplifizierung des Barcodes (bindet vor Uptagsequenz)
Downtag	CGGTGTCGGTCTCG TAG	Amplifizierung des Barcodes (bindet nach Downtagsequenz)
<i>TAL1::HGM1</i> -fwd	TAGTAAAATACTTC TCGAACTCGTCACA TATACGTGTACATA AGCTTGCCTTGTCC CCGCCG	Austausch von genomischen <i>TAL1</i> mit dem Antibiotikaresistenzgen <i>HGM1</i> (aus pAG32)
<i>TAL1::HGM1</i> -rev	GCATAAGGACATGG CCTAAATTAATATT TCCGAGATACTTCC TCGACACTGGATGG CGCGGT	Austausch von genomischen <i>TAL1</i> mit dem Antibiotikaresistenzgen <i>HGM1</i> (aus pAG32)
<i>NQM1::NTC</i> -fwd	CCATCTAGAATGGG GTGGACAACATATA AAAGAAGAG	Austausch von genomischen <i>NQM1</i> mit dem Antibiotikaresistenzgen <i>NTC</i> (aus pAG25)
<i>NQM1::NTC</i> -rev	TACGTCAGAAATTTT AATGAATATATAAG TCTGTACAC	Austausch von genomischen <i>NQM1</i> mit dem Antibiotikaresistenzgen <i>NTC</i> (aus pAG25)
<i>NQM1</i> -fwd	GAAGTATGAACCAC AGGATT	qRT-PCR von <i>NQM1</i> (Zielgen)
<i>NQM1</i> -rev	CAAAATCTTATCCA TGGCGT	qRT-PCR von <i>NQM1</i> (Zielgen)
<i>TAL1</i> -fwd	CCCATCATTGATCT TGGCTGC	qRT-PCR von <i>TAL1</i> (Zielgen)
<i>TAL1</i> -rev	GGCAGCTTGAATAC CTTCCCA	qRT-PCR von <i>TAL1</i> (Zielgen)

2 Material

<i>UBA4</i> -fwd	AAGAGAGCAGCTTG CCAAGA	qRT-PCR von <i>UBA4</i> (Kontrollgen)
<i>UBA4</i> -rev	TCCAGCACCAACTA CCAAAA	qRT-PCR von <i>UBA4</i> (Kontrollgen)
<i>ATG27</i> -fwd	AGTTGTGCTTGGCG GAGTAT	qRT-PCR von <i>ATG27</i> (Kontrollgen)
<i>ATG27</i> -rev	CCTGCGAGAAGCAT GATGTA	qRT-PCR von <i>ATG27</i> (Kontrollgen)
<i>TAF10</i> -fwd	CCAGGATCAGGTCT TCCGTA	qRT-PCR von <i>TAF10</i> (Kontrollgen)
<i>TAF10</i> -rev	TGCTGTCCTTGCAA TAGCTG	qRT-PCR von <i>TAF10</i> (Kontrollgen)

2.9 Plasmide

Tabelle 15: Plasmide

Plasmid	Hersteller/Vertreiber	Verwendung
pACT2	Clontech	Klonierung von <i>LEU2</i>
pAG25	Euroscarf	Klonierung von <i>natMX4</i>
pAG32	Euroscarf	Klonierung von <i>hphMX4</i>
pUC19	NEB	Bestimmung der Transformationseffizienz von <i>E. coli</i>
pHLUM	Michael Mülleler	Generierung von prototrophen Mutanten

2.10 Enzyme und Puffer

Tabelle 16: Enzyme/Puffer

Name	Artikelnummer	Hersteller
RNase Inhibitor	M0307 S	NEB
M-MuLV - Reverse Transcriptase Puffer	B0253 S	NEB
M-MuLV - Reverse Transcriptase	M0253 S	NEB
Maxima SYBR Green/ROX qPCR-Mix	K0221	Thermo Scientific
Phusion-HF-Polymerase	F530L	life technologies
T4-DNA-Polymerase	M0203 S	NEB
Phusion-HF-Puffer	F518L	life technologies
Phire-HotStart-II-DNA-Polymerase	F122L	life technologies
Phire-HF-Puffer	F524L	life technologies
<i>Taq/Pfu</i> -Polymerase (25:1)	-	MPIMG

2.11 DNA-Standards

Zur Bestimmung des DNA-Molekulargewichts unter Anwendung der Agarosegelelektrophorese wurden die folgenden DNA-Größenstandards verwendet.

Tabelle 17: DNA-Standards

Name	Artikelnummer	Hersteller
1 kb DNA-Ladder	N3232 L	NEB
100 bp DNA-Ladder	N3231 L	NEB

2.12 Software

Tabelle 18: Software

Name	Hersteller
Word 2010	Microsoft
Excel 2010	Microsoft
Powerpoint 2010	Microsoft
Illustrator	Adobe
Photoshop	Adobe
RStudio 0.97.551	RStudio
R (version 3.0.1)	The R Foundation for Statistical computing

3 Methoden

3.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion [engl.: polymerase chain reaction (PCR)] ist eine molekularbiologische Technik zur exponentiellen Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente. Dieser Drei-Stufen-Prozess beinhaltet das Denaturieren doppelsträngiger DNA, das Anlagern genspezifischer Oligonukleotide [engl.: Primerannealing] an die zu amplifizierenden Loci sowie die Neusynthese des komplementären DNA-Strangs durch den Einbau adäquater Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs; dATP, dGTP, dCTP, dTTP) über das Enzym DNA-Polymerase (Elongation). Für die PCR wurden im Wesentlichen zwei Standardprotokolle und drei DNA-Polymerasen verwendet. Die Menge an Ausgangs-DNA variierte dabei in Abhängigkeit der Verwendung. Für eine PCR mit genomischer DNA wurden zwischen 20-50 ng DNA verwendet. Für eine PCR mit Plasmiden wurde >1 ng Plasmid-DNA verwendet. Die Konzentration an Oligonukleotiden lag bei 10 pmol/ μ l und die der dNTPs bei 25 mmol/ml für jedes dNTP.

Tabelle 19: PCR-Protokolle

Protokoll 1		Protokoll 2	
10 x <i>Taq.</i> -Puffer	2.5 μ l	5 x Phire/Phusion-Puffer	4 μ l
5 x CES	5 μ l	5 x CES	4 μ l
dNTPs	0.2 μ l	dNTPs	0.16 μ l
Primer	5 pmol	Primer	5 pmol
<i>Taq.</i> - Pol.	5 U	Phire/Phusion - Pol.	0.2 U
Reaktionsvolumen	25 μ l	Reaktionsvolumen	20 μ l
Zyklen		Zyklen	
Denaturierung	96°C / 4 min	Denaturierung	98°C / 40 sec
Denaturierung	96°C / 20 sec	Denaturierung	98°C / 5 sec
Primerannealing	57°C / 15 sec	Primerannealing	57°C / 10 sec
Elongation	72°C / 40 sec	Elongation	72°C / 40 sec
zusätzl. Zyklen	31	zusätzl. Zyklen	31
finale Elongation	72°C / 5 min	finale Elongation	72°C / 60 sec
Lagerung	4°C	Lagerung	10°C

3.2 Kolonie-PCR von *S. cerevisiae*

Für eine Kolonie-PCR mit Hefezellen wurde eine einzelne Hefekolonie in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß mit 100 μ l ddH₂O eingerührt. 1 μ l dieser Lösung wurde mit 3 μ l 20 mM NaOH in einem PCR-Reaktionsgefäß bei 95°C für 5 min inkubiert. Alternativ dazu wurde die Hefekolonie in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und für 10 sec in der Mikrowelle bestrahlt, um die Zellen aufzubrechen. Im Anschluss wurde der Ansatz auf Eis gekühlt und mit dem PCR-Mastermix versetzt. Die PCR wurde nach dem Phire/Phusion-PCR-Protokoll durchgeführt (vgl. Tabelle 19).

3.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Für Proben, die der Sequenzierung dienten, wurden die PCR-Produkte mittels Ethanolpräzipitation aufgereinigt.

Bei der Ethanolpräzipitation wurde der Probe das zweifache Volumen an eiskaltem 100% Ethanol sowie $\frac{1}{10}$ Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5.2) zugesetzt. Danach wurde die Probe für ≥ 30 min bei -20°C gelagert, bevor sie bei 16.000 x g für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet zweimal mit 500 μ l 70% Ethanol gewaschen und im Anschluss wieder bei 16.000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Pellet bei Raumtemperatur bzw. in einem Heizblock bei 50°C getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 10 μ l ddH₂O gelöst.

Proben, die für andere Zwecke (z.B. Transformation, homologe Rekombination) vorgesehen waren, wurden mit dem Kit „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen bzw. mit dem Kit „DNA Clean & ConcentratorTM-5“ der Firma Zymo Research nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde in einer horizontalen Gelkammer durchgeführt, welche mit 0.8 - 1.4% (w/v) Agarose, gelöst und aufgeköcht in 1 x TAE-Puffer, befüllt war. Der Agarose wurden 0.002% (v/v) Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben-DNA wurde in 1 x Gelelektrophorese-Laufpuffer aufgenommen und in die Geltaschen

pipettiert. Die DNA-Fragmente im Gel wurden im Anschluss auf einem UV-Tisch bei 254 nm, wobei das DNA interkalierende Ethidiumbromid angeregt wird, zur Analyse sichtbar gemacht.

3.5 Herstellung kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung hitzekompetenter *E. coli* wurde das Protokoll von Inoue *et al.* [108] verwendet. 100 ml LB + 20 mM MgSO₄ wurden mit dem *E. coli* - Stamm DH5 α angeimpft und bei 23°C über Nacht in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 200 ml LB + 20 mM MgSO₄ mit 2 ml aus der Vorkultur versetzt und der Ansatz bei 23°C bis zu einem OD₆₀₀ = 0.6 inkubiert. Die Kultur wurde dann für 10 min auf Eis gekühlt, bevor sie für 10 min bei 4°C und 2000 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 64 ml TB-Puffer (4°C) aufgenommen. Nach erneuter Kühlung auf Eis und einer 10 min Zentrifugation mit 1500 x g bei 4°C wurde das Pellet in 16 ml TB-Puffer (4°C) + DMSO (finale Konzentration von 7% in TB) resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurde die Zellsuspension auf 0.5 ml Reaktionsgefäße verteilt und in Flüssigstickstoff (-80°C) gefroren.

Die Transformationseffizienz von *E. coli*, definiert als die Zahl an Zellen welche mit 1 μ g Plasmid-DNA transformiert werden kann, wurde durch die Transformation von 10 pg pUC19 Plasmid-DNA und 40 μ l *E. coli* DH5 α - Zellen bestimmt. Die errechnete Transformationseffizienz lag bei 5×10^8 transformierten Zellen pro ml *E. coli* - Zellen und μ g Plasmid.

3.6 Transformation von *E. coli*

40 μ l hitzekompetente *E. coli* DH5 α - Zellen wurden mit 50-100 ng Plasmid-DNA gemischt und für 20 min auf Eis gekühlt. Der Ansatz wurde daraufhin für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach Zugabe von 800 μ l LB wurden die transformierten Zellen bei 37°C für 1 - 1.5 h inkubiert und danach bei 10.000 x g für 30 sec abzentrifugiert. 600 μ l vom Überstand wurden verworfen und das Zellpellet in den restlichen 200 μ l resuspendiert und auf LB^{Amp} - Selektionsplatten ausplattiert.

3.7 Plasmidextraktion aus *E. coli*

Die Extraktion von Plasmiden aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Kits „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Zuvor wurde der *E. coli* - Stamm mit dem gewünschten Plasmid in 3 ml LB^{Amp} angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert.

3.8 DNA-Extraktion aus *S. cerevisiae*

Die Extraktion genomischer DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll von Harju *et al.* [109]. 1.5 ml einer Hefe-Übernachtskultur (ÜNK, 20-24 h bei 30°C in YPD) oder eine einzelne Hefekolonie (gelöst in 100 µl ddH₂O) wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 16.000 x g für 5 min pelletiert und anschließend in 200 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Die Zellpellets wurden dann (zweimal) alternierend erst für 2 min in ein Trockeneis-Ethanol-Bad gefroren und dann für 1 min bei 95°C in einem Heizblock erhitzt. Danach wurden die lysierten Zellen für 30 sec gevortext, mit 200 µl Chloroform versetzt und erneut für 2 min gevortext. Anschließend wurden die Proben bei 16.000 x g für 3 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß transferiert, was bereits mit 400 µl eiskaltem 100% Ethanol befüllt war. Die Proben wurden durch invertieren vermischt und bei -20°C für ≥ 15 min gelagert. Die ausgefällte genomische DNA wurde bei 16.000 x g für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 0.5 ml 70% Ethanol gewaschen und im Anschluss erneut bei 16.000 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets luft- bzw. bei 50°C in einem Heizblock getrocknet und abschließend in 50 µl ddH₂O gelöst.

3.9 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll von Gietz *et al.* [110]. Eine Vorkultur des zu transformierenden Hefestammes wurde über Nacht bei 30°C in YPD inkubiert. Die Hauptkultur wurde am nächsten Tag in 10 ml YPD auf einen OD₆₀₀ = 0.3 angeimpft und bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase [engl.: mid-log phase] bei OD₆₀₀ = 0.8 - 1.0 bei 30°C in einem

Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 5000 x g für 30 sec abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde dann zweimal mit je 1 ml ddH₂O gewaschen und dazwischen bzw. am Ende wieder bei 5000 x g für 30 sec abzentrifugiert. Ein Ansatz bestehend aus 200 µl PEG 3350 (60% (w/v)), 36 µl 1 M LiAc, 50 µl einzelsträngige Lachsspermium-Träger-DNA (2 µg/µl, erhitzt auf 95°C) und 74 µl DNA, PCR-Produkt bzw. Plasmid enthaltendes ddH₂O (DNA-Konzentrationen ~ 300 ng) wurde dem Zellpellet zugeführt und dieses darin resuspendiert. Der Ansatz wurde für 40 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Es folgte eine Zentrifugation bei 5000 x g für 1 min. Wurden Antibiotikaresistenzgene transformiert, so wurden die Zellen für eine weitere Stunde in 1 ml YPD bei 30°C inkubiert. Für Transformationen mit Auxotrophiemarkern wurde diese Postinkubation übersprungen und die Zellpellets direkt in 100 µl ddH₂O resuspendiert und auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

3.10 Kreuzung von *S. cerevisiae*

Klassische Kreuzung:

Bei der klassischen Kreuzungsmethode werden die haploiden (MAT a bzw. MAT α) Hefemutanten aus den Kryostocks zuerst zum Anwachsen auf YPD ausgestrichen. Nachdem sich Einzelkolonien gebildet haben, werden diese in einer Kreuzform auf frischen YPD-Agar ausgestrichen, sodass sich die MAT a und MAT α - Stämme überlappen [111, 112]. Im Anschluss werden die Platten für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Aus dem Kreuzungspunkt werden nun mit einer Impföse Hefezellen entnommen und auf das Diploidenselektionsmedium YNB^{+His/+Ura/+Leu/+Ade/+Trp} ausgestrichen und für einen Tag bei 30°C inkubiert.

Kreuzung für kompetitiven chronologischen Alterungsscreen:

Die Kreuzungsreaktion wurde im großen Maßstab in 96-Well-Platten, mit dem Ziel der Generierung von multiplen heterozygoten Hefedoppelmutanten, durchgeführt. Dazu wurden 85 *LEU2* - positive MAT a - Stämme (vgl. Tabelle 8) in neun 96-Well-Platten mit jeweils 50 µl YPD/Well eingerührt. Die 85 *kanMX4* - positiven MAT α - Stämme (vgl. Tabelle 8) wurden zeitgleich auf eine 96-Well-Platte mit jeweils 50 µl YPD/Well verteilt. Die Platten wurden bei 30°C für 24 h inkubiert. Dann

wurden jeweils 10 MAT α - Stämme von der vorbereiteten 96-Well-Platte in einem 15 ml Reaktionsröhrchen kombiniert und mit YPD auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt. Davon wurden im Anschluss 75 μ l/Well auf eine der neun mit MAT a - Stämmen belegten 96-Well-Platten verteilt. Die so entstanden 9 Platten mit der MAT a / MAT α - Stammischung wurden auf YPD-Agar ausgestempelt und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Stämme zur Selektion der diploiden Zellen auf SC^{-Leu/G418} - Selektionsagar umgestempelt (800 μ g/ml G₄₁₈) und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Im letzten Schritt wurden die entstandenen 6970 diploid heterozygoten Doppelmutanten zusammengeführt. Dazu wurden pro Platte je 2 ml SC^{-Leu/G418} zugegeben und die Stämme mittels eines Drigalski-Spatels in Suspension gebracht. Abschließend wurden alle Stammsuspensionen in einem Erlenmeyerkolben gesammelt und für 3-4 h bei 30°C inkubiert, bevor sie auf 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in Flüssigstickstoff (-80°C) eingefroren wurden.

3.11 Haploprofizienzscreen (kompetitives Altern)

Für den Haploprofizienzscreen bzw. die kompetitiven chronologischen Alterungsexperimente wurden ÜNK des diploiden Wildtypstamms BY4743 zusammen mit der Kollektion an diploid heterozygoten Hefedoppelmutanten in 100 ml SC in einem 1:1 Verhältnis auf einen OD₆₀₀ = 0.3 eingestellt. Der Ansatz wurde für 32 Tage bei 30°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellviabilität wurde jeden zweiten bis vierten Tag gemessen, indem verschiedene Verdünnungen in Triplikaten zum einen auf SC-Agar ausplattiert wurden, auf denen sowohl die Mutanten als auch der Wildtyp wachsen konnte und zum anderen auf SC^{-Leu} - Agar, wo nur die Mutanten wachsen konnten. In der Zwischenzeit wurden die Kulturen weiterhin bei 30°C inkubiert. Die Kolonien wurden gezählt und als koloniebildende Einheiten pro Milliliter [engl.: colony forming units (CFU/ml)] angegeben.

3.12 Nicht-kompetitives Altern

Die nicht-kompetitiven Alterungsexperimente (klassisch chronologisches Altern) wurden in Quadruplikaten durchgeführt, wobei eine ÜNK des jeweiligen haploiden Stammes für die Hauptkultur in 100 ml SC auf einen OD₆₀₀ = 0.3 eingestellt wurde.

Der Ansatz wurde bis zum Eintritt der stationäre Phase inkubiert (2 Tage/30°C) und die Zellviabilität ab diesem Zeitpunkt für weitere 14 Tage, analog zu der, in Abschnitt 3.11 beschriebenen Methode, aufgezeichnet.

3.13 Extraktion und Sequenzierung molekularer Barcodes

Zur Extraktion der molekularen Barcodesequenzen, welche zur eindeutigen Identifizierung von Hefedeletionsmutaten notwendig sind, wurde genomische DNA, wie in Abschnitt 3.8 beschrieben, aus Hefezellen isoliert. Die darauffolgende PCR-Reaktion zur Amplifikation der Barcodesequenzen wurde nach dem im Abschnitt 3.1 beschriebenen Phire/Phusion-PCR-Protokoll durchgeführt. Als Primerkombination wurde Uptag/Downtag verwendet (vgl. Tabelle 14). Die PCR-Produkte (~ 300 bp) wurden anschließend, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, mittels Ethanolpräzipitation aufgereinigt. Für die Sequenzierungsreaktionen wurde der Primer pFA6-rev (zur Sequenzierung des Uptags) und der Primer pFA6-fwd (zur Sequenzierung des Downtags) verwendet (vgl. Tabelle 14). Bei der Isolierung der Barcodesequenzen aus Hefedoppelmutanten wurde analog vorgegangen. Für die PCR-Reaktion wurden jedoch zwei Primerpaare verwendet. Der Uptag-Barcode des ursprünglichen MAT α - Stamms wurde mit dem Primerpaar Uptag/pFA6-rev (bindet innerhalb des *kanMX4* - Markers) amplifiziert. Der Downtag-Barcode des ursprünglich MAT α - Stamms wurde mit dem Primerpaar *LEU2*-fwd/Downtag (bindet innerhalb des *LEU2* - Markers) amplifiziert (vgl. Tabelle 14).

Die Sequenzierung der Proben erfolgte durch die Sequencing Core Facility von Dr. Bernd Timmermann am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (MPIMG, Berlin, Deutschland) nach der Methode von Frederick Sanger [113].

3.14 Extraktion von Zuckerphosphatmetaboliten

Die Zuckerphosphate wurden nach dem Protokoll von Gruening *et al.* extrahiert und quantifiziert [114]. Die Hefestämme wurden dazu zuvor in SC kultiviert und in der mittleren log-Phase bei einem $OD_{600} = 1.5 \pm 0.05$ mit der „kaltes Methanol“ [engl.: cold methanol] - Methode gequenchet [115]. Zur Zellyse wurden die Zellen in

200 μl organischem Extraktionspuffer (75:25 Acetonitril:Wasser-Gemisch + 0.2% Methansäure) aufgenommen und mittels mehrerer „FastPrep-24“ - Zyklen (3 x 20 sec, 6.5 m/s) aufgeschlossen. Nach einem weiteren Extraktionsschritt mit derselben Menge an Wasser wurden die Überstände beider Extraktionsschritte kombiniert, getrocknet (SpeedVac), in einem 100 μl Wasser:Acetonitril-Gemisch (93:7) resuspendiert und der LC-MS/MS - Analyse zugeführt. Alle Lösungsmittel wurden in HPLC oder höheren Reinheitsgraden verwendet.

Die Metabolitextraktionen wurde von Dr. Markus Keller (Ralser group, Dept. of Biochemistry, University of Cambridge, UK) durchgeführt.

3.15 LC-MS/MS - Quantifizierung von Zuckerphosphaten

1.5 μl der extrahierten Proben wurden zur Separierung in eine C8 - Säule (Agilent Zorbax SB-C8 Rapid Resolution HD, 2.1x100 mm, 1.8 μm) injiziert. Zur Separierung wurde ein Gradient beginnend mit einem isokratischen Fluss von eines Acetonitril:Wasser - Gemisches (12:88) für 3.5 min, ansteigend auf ein Acetonitril:Wasser-Verhältnis von 38:62 für 2.5 min, gefolgt von einem 30 sec Waschschrift bei 42% Acetonitril und nachfolgender Re-Equilibration für 30 sec, verwendet. Die Gesamtzyklusdauer belief sich auf 7.5 min. 750 mg/l Octyl-Ammoniumacetat wurde allen Puffern als Ionenpaarungsreagenz [engl.: ion pairing reagent] beigegeben [116]. Die Analyten wurden im MRM-Modus mittels eines online-gekoppelten Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers (Agilent 6460) gemessen. Jeder Metabolit wurde durch den Vergleich von Retentionszeiten und dem charakteristischen Fragmentationsverhalten mit extern gemessenen, kommerziell erwerblichen Standards identifiziert. Optimale SRM-Übergänge, Ionisierungs- und Fragmentationsenergien der Metabolite sowie die Parameter der Ionenquelle sind der Publikation von Keller *et al.* entnommen [117]. Die Software Masshunter (Agilent) wurde für die Peak-Integration, externe Kalibrierung (mit repetitiver Messung von Standardverdünnungskurven), absolute Quantifizierung und primäre Datenanalyse verwendet. Alle weiteren Datenanalysen wurden mit der Software Microsoft Excel 2010 bzw. mit R durchgeführt.

Die LC-MS/MS - Quantifizierungen sowie die Erstellung der Rohdaten wurden von Dr. Markus Keller (Ralser group, Dept. of Biochemistry, University of Cambridge, UK) durchgeführt.

3.16 LC-MS/MS - Quantifizierung von Polyolen

Die LC-MS/MS - Analysen zur Quantifizierung von Polyolen wurden, wie von Wamelink *et al.* beschrieben [118,119], durchgeführt. Die Flüssigkeitschromatographie (Shimadzu Nexera Liquid Chromatograph System USA) wurde mit Hilfe einer Aminex HPX-87C - Säule (250 x 4.0 mm, bead size 9 μm , BioRad Laboratories, Veenendaal, The Netherlands) durchgeführt. Als isokratische mobile Phase wurde ein 40% Acetonitril/Wassergemisch bei einer Flussrate von 0.4 ml/min verwendet. Die Säulentemperatur wurde bei 70°C konstant gehalten. 30 μl der Probe wurden injiziert und die Gesamtlaufzeit betrug 25 min. Die Quantifizierung der Polyole erfolgte mittels eines AB Sciex API 5000 Tandem-Massenspektrometers, welches mit einer Elektrospray-Ionenquelle ausgestattet war und im negativen Modus operierte. Folgende Parameter wurden dazu eingestellt: Spannung der Ionensprays -4500 V; Ionenquellentemperatur 400°C; Curtain Gas und Cad Gas wurden auf 10 und 6 (willkürliche Einheiten [engl.: arbitrary units]) eingestellt; andere MS/MS - Einstellungen wie bspw. Declustering Potential (DP) und die Kollisionenergie (CE) wurden für jedes Polyol entsprechend optimiert. Die Detektion der Polyole erfolgte im MRM-Modus. Die Einstellung der MRM-Übergänge (Q1/Q3) sowie die DP- und CE-Einstellungen wurden für die jeweiligen Polyole wie folgt eingestellt: Erythritol und Threitol (C₄-Polyole) m/z 121.1/89.1 (DP=-38V, CE=-16V); (¹³C₄)Erythritol m/z 125.1/92.1 (DP=-38V, CE=-16V) (IS C4); Ribitol, Arabitol and Xylitol (C₅-Polyole) m/z 151.1/89.1 (DP=-38V, CE=-16V); (¹³C₅) Arabitol (IS C5) m/z 153.1/91.1 (DP=-38V, CE=-16V); Galactitol, Sorbitol und Mannitol (C₆-Polyole) m/z 181.1/89.1 (DP=-45V, CE=-22V); (¹³C₆-)Sorbitol (IS C6) m/z 184/89 (DP=-45V, CE=-22V); Sedoheptitol und Perseitol (C₇-Polyole) m/z 211.1/89.1 (DP=-45V, CE=-23V) Sedoheptulose und Mannoheptulose (C₇-Zucker) m/z 209.1/119.1 (DP=-35V, CE=-13V) an (¹³C₅)-Xylulose (IS C7-Zucker) m/z 151.1/91.1 (DP=-38V, CE=-16V). Die gewonnenen Daten wurden mit der Software „Analyst™ for Window NT (Ver. 1.5.2)“ prozessiert.

Die LC-MS/MS - Quantifizierungen der Polyole wurden von Dr. Mirjam M.C. Wamelink (Metabolic Unit, Dept. of Clinical Chemistry, VU University Medical Centre Amsterdam, NL) durchgeführt.

3.17 Osmolalitätsmessungen

Die Osmolalität wurde durch die Methode der Kältepunkterniedrigung mittels eines Knauer Osmometers (Knauer) bestimmt. Dazu wurden während der nicht-kompetitiven Alterungsexperimente zu den angegebenen Zeitpunkten (Tag 2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14) 1 ml Aliquots der jeweiligen Hefestämme aus den Kolben entnommen. Die Hefezellen wurden bei 16.000 x g für 2 min abzentrifugiert, der Überstand in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 16.000 x g für 2 min zentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden zur Bestimmung der Osmolalität in ein Glasvial überführt und in Triplikaten gemessen.

3.18 Stresstests

Intrazellulärem Stress wurde durch Zugabe von oxidativen (Diamid, Cumolhydroperoxid, *tert*-Butylhydroperoxid, Menadion, H₂O₂, Juglone), reduktiven (DTT, N-Acetyl-Cystein, Gluthation], osmotisch wirksamen (Sorbitol, NaCl, KCl) sowie Schwermetallstress auslösenden Substanzen (MnCl₂) ausgelöst. Die Substanzen wurden in den angegebenen Endkonzentrationen dem SC-Agar bzw. SC-Flüssigmedium zugegeben.

3.19 Extraktion von RNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae* wurden das Kit „RiboPureTM RNA Purification Kit, yeast“ der Firma Ambion/life technologies sowie das Kit „RNAeasy Mini Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben der Hersteller verwendet.

3.20 cDNA-Synthese für qRT-PCR

2 μg Gesamt-RNA aus Hefezellen wurde mit 12-18mer Oligo-dT-Primern und der Moloney-Murine-Leukemia-Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase (NEB) nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben.

3.21 Quantitative Reverse Transcriptase-PCR (qRT-PCR)

Eine $\ddot{\text{U}}\text{NK}$ des jeweiligen Hefestammes wurde auf einen $\text{OD}_{600} = 0.15$ eingestellt und bis zum Erreichen der mittleren log-Phase $\text{OD}_{600} = 0.8 - 1.0$ in SC (für qRT-PCR von Stresstests mit Menadion, H_2O_2 , NaCl, Sorbitol) oder für die Experimente mit wechselnden Kohlenstoffquellen in SC mit entweder 2% Glucose, 2% Galactose, 3% Ethanol + 0.1% Glucose oder 3% Glycerin + 0.1% Glucose kultiviert. Für die qRT-PCR mit verschiedenen Messzeitpunkten (bei Stresstests mit Menadion, H_2O_2 , NaCl, Sorbitol) wurden die Proben an den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Bei den Experimenten mit verminderter Glucosekonzentration wurden die Hefestämme bis zur mittl. log-Phase in 80 ml SC + 2% Glucose kultiviert. Davon wurden 20 ml Aliquots bei 2000 x g für 2 min abzentrifugiert und danach entweder auf Trockeneis gefroren oder in SC mit 0.5% oder 0.05% Glucose resuspendiert und für 1 h bei 30°C inkubiert. Die qRT-PCR wurde in einem Prism 7900HT Cyclyer (Applied Biosystems) mit genspezifischen Primern (vgl. Abschnitt 2.8, Tabelle 14) und dem Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (Thermo Scientific) durchgeführt. Die relativen Expressionsraten der Zielgene wurden mittels des geometrischen Mittels auf drei endogene Referenzgene (*UBA4*, *ATG27*, *TAF10*) nach der Methode von Pfaffl *et al.* normalisiert [120].

3.22 Bestimmung der Wachstumsraten von Glycolyse-/PPP-Mutanten

Zur Bestimmung der Wachstumsraten von prototrophen Glycolyse-/PPP-Mutanten (vgl. Tabelle 9) wurden diese in 150 μl SM, versetzt mit entweder Glucose, Galactose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle (vgl. Tabelle 11), über Nacht in 96-Well-Platten

angezogen. Für die Hauptkultur wurde eine 1:20 Verdünnung der ÜNK hergestellt und davon 75 μl /Stamm in Quadruplikaten in eine 384-Well-Platte überführt. Die Platten wurden zur Aufzeichnung der Wachstumskurven in einem photometrischen Plattenlesegerät [engl.: photometric plate reader] bei 30°C für 50 h inkubiert. Die Wachstumskurven wurden im Anschluss mit dem Programm R analysiert und als relative Wachstumsraten ausgedrückt.

3.23 Extraktion von Aminosäuren

Zur Extraktion der freien Aminosäuren wurden die prototrophen Stämme (vgl. Tabelle 9) zuvor in je 200 μl /Well der verschiedenen Minimalmedien SM-Glucose, SM-Galactose, SM-Ethanol (vgl. Tabelle 9) über Nacht kultiviert. Für die Hauptkultur am nächsten Tag wurden 85 μl der ÜNK in 1.6 ml (entspricht einer 1:20 Verdünnung) des entsprechenden Mediums überführt (96-DeepWell-Platten). Die Stämme wurden danach bei 30°C in einem Schüttelinkubator inkubiert (Glucose/Galactose 8 h; Ethanol 10 h). Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 x g für 3 min. Nach dem Abschlagen des Überstandes wurden pro Well 180 μl 80°C heißer 50% Ethanol zupipettiert und die Deep-Well-Platte im Anschluss für 2.5 min in einem Wasserbad bei 80°C inkubiert und anschließend für einige Sekunden gevortext. Es folgte eine zweite Inkubation im Wasserbad mit anschließendem vortexen. Danach wurden die Platten bei 3000 x g für 5 min zentrifugiert und 150 μl des Überstandes in eine neue 96-Well-Platte mit konischen Wells überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min. Zum Abschluss wurden 50 μl des Überstandes aus jedem belegten Well in eine 384-Well-Platte überführt. Die Platte wurde mit Aluminiumfolie abgeklebt und bei -80°C auf Trockeneis eingefroren. Pro Kohlenstoffquelle (Glucose, Galactose, Ethanol) wurden die Extraktionen in Triplikaten (3 Platten je Kohlenstoffquelle) durchgeführt und diese am Ende zusammen in eine 384-Well-Platte überführt.

3.24 Quantifizierung von Aminosäuren

Die freien Aminosäuren wurden durch hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie (HILIC) mit einer ACQUITY UPLC BEH Amid-Säule (130 , 1.7 μm ,

2.1 mm x 100 mm) bei gradueller Elution mit einer konstanten Flussrate von 0.9 ml/min und einer Säulentemperatur von 25°C aufgetrennt. Für die Eluenten A und B wurden 10 mM Ammoniumformiat und 0.176% Methansäure verwendet. Für Eluent A wurde dies in einen Gemisch aus Acetonitril/ Methanol/ Wasser (95:5:5) aufgenommen. Bei Eluent B wurde ein 50:50 Acetonitril / Wassergemisch verwendet. Für alle Substanzen wurde ein UPLC-Reinheitsgrad verwendet. Für die graduelle Elution wurden die folgenden chromatographischen Parameter eingestellt: Lösung B wurde für 0.7 min bei 85% gehalten bevor sie gleichmäßig innerhalb von 2.55 min bis auf 5% reduziert wurde. Diese Konzentration wurde für 0.05 min beigehalten bevor sie wieder auf den Startwert von 85% innerhalb von 0.05 min erhöht wurde. Es folgte ein Equilibrationsschritt für 3.25 min bevor die nächste Probe injiziert wurde. Die Temperatur des Auto-Samplers wurde bei 4°C gehalten. Da die hydrophile Interaktionsflüssigkeitschromatographie anfällig gegenüber einer Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase ist, sollten weniger als 3 μ l einer Probe (\sim 80% Ethanol) injiziert werden, um die Trennungsleistung stabil zu halten. Der Probenfluss wurde dann in ein Agilent 6460 - Tripel - Quadrupol - Massenspektrometer eingeleitet, welches im SRM-Modus operierte. Für die Ionenquelle wurden folgende Parameter eingestellt: Zellbeschleunigungsspannung 7 V, Gasfluss 8 l/min bei 300°C, Sheath-Gasfluss 11 l/min und 300°C, Nebulizer-Druck 50 psi, negative Kapillarspannung 3000 V und Düsenanspannung (nozzle voltage) 500 V. Jeder Metabolit wurde durch den Vergleich von Retentionszeiten und dem charakteristischen Fragmentationsverhalten mit extern gemessenen, kommerziell erwerblichen Standards identifiziert und durch externe Kalibrierung, über eine Verdünnungsreihe des Standardmix, welche die Bereiche von 15-fach niedrigeren bzw. höheren Konzentrationen als die eigentlich zu Erwartende abdeckt, quantifiziert. Sämtliche Aminosäuretrennungs- und Quantifizierungsverfahren sowie die Zusammenstellung der Rohdaten wurden von MSc. Michael Müllender (Ralser Group, Dept. of Biochemistry, University of Cambridge, UK) durchgeführt.

4 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation aufgezeigt. Die Ergebnisse sind dabei inhaltlich in zwei Themenbereiche aufgeteilt. Der erste Abschnitt befasst sich dabei schrittweise mit der Beschreibung von der Herstellung der diploid heterozygoten *S. cerevisiae* - Doppelmutantenbank, welche zur Durchführung eines kompetitiven chronologischen Alterungsexperiments (Haploprofizienzscreen) eingesetzt wurde. Weiterhin werden die daraus resultierenden haploprofizienten Deletionsmutanten funktionell charakterisiert, um deren gegenseitige Abhängigkeit bzw. deren gemeinsamen Wirkungsmechanismus unter verschiedenen Bedingungen zu demonstrieren [121].

Im zweiten Abschnitt wird die Frage erörtert, inwiefern sich genetische Störungen des Kohlenhydratstoffwechsel (Glycolyse/PPP) unter verschiedenen Umweltbedingungen, simuliert durch die Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen (Glucose, Galactose, Ethanol), einerseits auf das Wachstumsverhalten und andererseits auf die Verteilung der freien proteinogenen Aminosäuren in prototrophen Stoffwechselmutanten auswirken.

4.1 Chronologische Alterungsexperimente von *S. cerevisiae* - Mutanten

Der Ausgangspunkt für die Durchführung der hier beschriebenen kompetitiven Alterungsexperimente waren die Resultate einer Studie von Powers *et al.* [104]. In dieser Studie wurde die diploid homozygote MAT a - Deletionsbank auf den Phänotyp des chronologischen Alterns hin untersucht und die Deletionsmutanten anhand der Länge bzw. Dauer ihrer chronologischen Lebensspanne sortiert. Einige der in der Liste vertretenen Deletionsmutanten wurden bereits in früheren Studien mit einer verlängerten chronologischen Lebensspanne assoziiert und konnten auch

mit anderen Genen in funktionellen Zusammenhang bezüglich der Regulation des chronologischen Alterns gebracht werden. Dies war jedoch nicht für alle untersuchten Gene der Fall, sodass ihr biochemischer Wirkungsmechanismus immer noch relativ unklar ist.

Um der Aufklärung einer möglichen Interaktion der bisher unbekanntes Alterungsgene mit bereits in diesem Zusammenhang beschriebenen Genen bzw. Mechanismen näher zu kommen, sollten die Top 90 der von Powers *et al.* gelisteten Deletionsstämme (höchste Langzeitüberlebensdauer) zur Herstellung einer heterozygoten MAT a/ MAT α - Doppelmutantenbank verwendet werden.

4.1.1 Herstellung einer heterozygoten

MAT a/ MAT α - Doppelmutantenbank

Von den Top 90 der ursprünglich von Powers *et al.* als langlebig definierten Deletionsstämmen konnten in unserer Kopie der Deletionsbank 82 MAT a und 85 MAT α - Stämme gefunden werden (vgl. Tabelle 8). Da sowohl die MAT a als auch die MAT α - Stämme ein *kanMX4* - Antibiotikaresistenzgen (~ 1564 bp) im deletierten Genlokus tragen, musste der Paarung der haploiden Stämme zunächst ein Austausch des *kanMX4* - Markers vorausgehen, da sonst die Doppeldeletion nicht eindeutig via Barcodesequenzierung verifizierbar wäre. Dazu wurde in den 82 MAT a - Stämmen der *kanMX4* - Marker durch einen *LEU2* - Marker ersetzt. Der *LEU2* - Marker wurde aus dem Plasmid pACT2 (vgl. Tabelle 15) mit den Primerpaar *kanMX4::LEU2*-fwd/rev amplifiziert, wie in Abschnitt 3.9 beschrieben transformiert und durch homologe Rekombination in den Ziellokus integriert. Positive Transformanten wurden auf SC^{-Leu}-Agar selektiert. Die korrekte Integration des 2170 bp großen *LEU2* - DNA-Fragments wurde durch Kolonie-PCR, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, verifiziert.

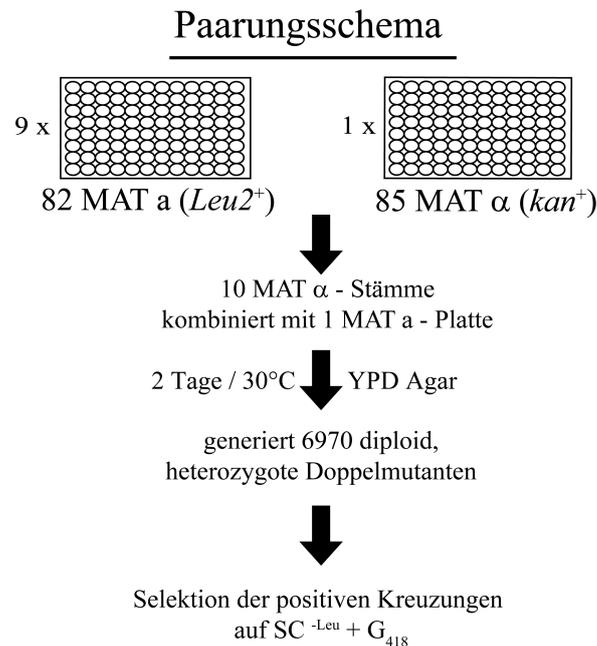


Abbildung 5: Herstellung der Hefedoppelmutantenbank für Haploprofizienzscreen. Schematische Übersicht der Herstellung der Doppelmutantenbank für den Haploprofizienzscreen.

Nach dem erfolgreichen Austausch des *kanMX4* - Markers gegen den *LEU2* - Marker in allen 82 MAT a - Stämmen wurden diese, wie in Abschnitt 3.10 beschrieben und analog in Abbildung 5 dargestellt, gegen die 85 MAT α - Stämme gekreuzt. Nach Ablauf der Kreuzungsreaktion wurden die daraus hervorgegangenen diploid heterozygoten Zellen auf SC^{-Leu/G418}-Agar selektiert und abschließend wie in Abschnitt 3.10 beschrieben gepoolt. Die Zellzahl im Pool wurde durch eine serielle Verdünnungsreihe auf YPD-Agar bestimmt und lag bei 7×10^6 Zellen/ml.

4.1.2 Haploprofizienzscreen

Der kompetitive haploprofiziente Alterungsscreen wurde wie in Abschnitt 3.11 beschrieben durchgeführt. Analog zu den gepoolten Kulturen wurde der Trend der Viabilität für den Wildtyp (Wt) und die Doppelmutantenbank auch separat in nicht-kompetitiver Umgebung aufgezeichnet. Die separaten Viabilitätskurven für den Wildtyp bzw. die Doppelmutanten innerhalb der Pools ergeben sich durch das parallele Ausplattieren der Proben auf einerseits SC-Agar, wo sowohl Wildtyp als auch die Mutanten wachsen konnten, und andererseits auf SC^{-Leu} - Selektionsagar, wo nur die *LEU2*-positiven Mutanten wachsen konnten, sodass die entsprechenden

4 Ergebnisse

Werte durch Subtraktion gebildet werden konnten. Abbildung 6 zeigt den Verlauf des kompetitiven Alterungsexperiments.

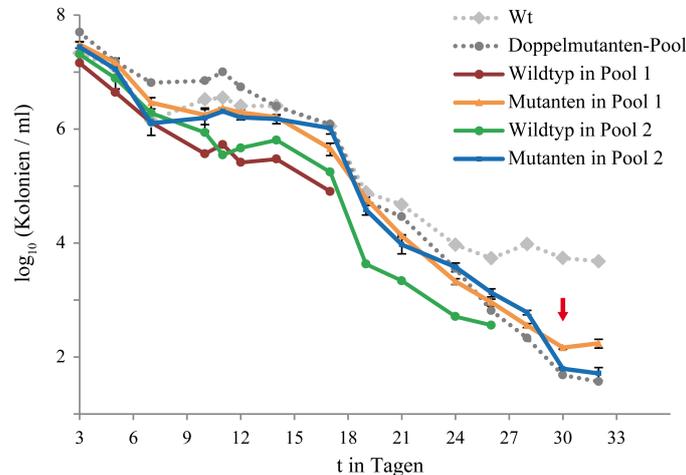


Abbildung 6: Viabilitätstrend im Haploprofizienzscreen. Der nicht-kompetitive Wildtyp (hellgrau gestrichelt), die Doppelmutantenbank (dunkelgrau gestrichelt), der 1. kompetitive Pool aufgeteilt in Wildtyp (dunkelrot) und Mutanten (orange) sowie der 2. kompetitive Pool mit Wildtyp (grün) und den Mutanten (blau) sind dargestellt. Der nicht-kompetitive Wildtyp zeigt ein verlängertes Überleben im Vergleich zum Wettbewerb mit der Doppelmutantenbank, wo er noch vor den Mutanten letal wird. Die Viabilität ist in Kolonien/ml angegeben. Der rote Pfeil markiert den Zeitpunkt der klonalen Selektion zur Analyse der molekularen Barcodes. Die Experimente wurden in unabhängigen Duplikaten angesetzt und die Auszählung der Kolonien erfolgte in Triplikaten. Fehler = \pm Stabw.

Nachdem die Kulturen bis zur stationären Phase angewachsen waren, wurde ab Tag 3 in allen Kulturen ein Absinken der Viabilität bis Tag 7 festgestellt. Danach befanden sich die Kulturen in einer Plateauphase, die durch eine relativ geringe Sterblichkeit gekennzeichnet war und bis Tag 15-18 anhielt. Im weiteren Verlauf des Experiments stieg die Sterblichkeit der Kulturen rapide und nahezu linear an, was durch den Rückgang der Zellteilungsfähigkeit anhand der Anzahl der Kolonien/ml erkennbar war. Die Wildtypen innerhalb der gepoolten Kulturen hatten am Tag 18 (Wt in Pool 1) bzw. Tag 26 (Wt in Pool 2) weitestgehend ihre Viabilität verloren, während die Doppelmutanten in beiden Pools weiterhin zur Koloniebildung befähigt waren. Im nicht-kompetitiven Experiment zeigte der Wildtyp jedoch eine längere Überlebensdauer. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die heterozygoten Doppelmutanten in den kompetitiven Experimenten einen Überlebensvorteil gegenüber dem Wildtyp aufwiesen.

4.1.3 Identifizierung haploprofizienter Doppelmutanten

Zur Identifizierung haploprofizienter Mutanten, welche sich durch eine erhöhte Überlebensfähigkeit in der stationären Phase auszeichnen, wurden am Tag 30 der kompetitiven Experimente zufällig je 32 Klone der beiden Replikate isoliert und deren molekulare Barcodes, nach der in Abschnitt 3.13 beschriebenen Methode, extrahiert und sequenziert. Im Ergebnis konnten 39 Haplotypen, bei denen zwei Gene deletiert waren, eindeutig identifiziert werden. Tabelle 20 fasst die haploprofizienten Stämme zusammen.

Tabelle 20: Haploprofiziente Doppelmutanten

#	Δ ORF 1	Δ ORF 2	Δ Gen 1	Δ Gen 2	Replikat
1	Δ YJL129C	Δ YHR204W	Δ trk1	Δ mnl1	Replikat 1
2	Δ YBL103C	Δ YER040W	Δ rtg3	Δ gln3	Replikat 2
3	Δ YCR037C	Δ YKL081W	Δ pho87	Δ tef4	Replikat 2
4	Δ YDL133C-A	Δ YHR158C	Δ rpl41b	Δ kel1	Replikat 1
5	Δ YDL133C-A	Δ YGL139W	Δ rpl41b	Δ flc3	Replikat 1
6	Δ YDL133C-A	Δ YOR179C	Δ rpl41b	Δ syc1	Replikat 1
7	Δ YDL133C-A	Δ YER132C	Δ rpl41b	Δ pmd1	Replikat 2
8	Δ YDL172C	Δ YGL083W	unbekannt	Δ syc1	Replikat 2
9	Δ YER040W	Δ YDR515W	Δ gln3	Δ slf1	Replikat 2
10	Δ YGL083W	Δ YDR515W	Δ syc1	Δ slf1	Replikat 1
11	Δ YGR045C	Δ YER040W	unbekannt	Δ gln3	Replikat 1
12	Δ YGR045C	Δ YFR041C	unbekannt	Δ erj5	Replikat 1
13	Δ YGR045C	Δ YGR161C	unbekannt	Δ rts3	Replikat 2
14	Δ YGR045C	Δ YJR066W	unbekannt	Δ tor1	Replikat 2
15	Δ YGR057C	Δ YJL129C	Δ lst7	Δ trk1	Replikat 1
16	Δ YGR059W	Δ YGR043C	Δ spr3	Δ nqm1	Replikat 1
17	Δ YGR059W	Δ YGL139W	Δ spr3	Δ flc3	Replikat 1
18	Δ YHL034C	Δ YKR095W	Δ sbp1	Δ mlp1	Replikat 1
19	Δ YHL034C	Δ YHR142W	Δ sbp1	Δ chs7	Replikat 2
20	Δ YHR139C	Δ YHR125W	Δ sps100	unbekannt	Replikat 2
21	Δ YHR167W	Δ YGR044C	Δ thp2	Δ rme1	Replikat 1
22	Δ YHR167W	Δ YHR003C	Δ thp2	Δ tcd1	Replikat 2
23	Δ YIL056W	Δ YHR111W	Δ vhr1	Δ uba4	Replikat 1
24	Δ YIL056W	Δ YHR111W	Δ vhr1	Δ uba4	Replikat 1
25	Δ YIL056W	Δ YGR043C	Δ vhr1	Δ nqm1	Replikat 2
26	Δ YIL056W	Δ YGR043C	Δ vhr1	Δ nqm1	Replikat 2
27	Δ YIL056W	Δ YGR043C	Δ vhr1	Δ nqm1	Replikat 2
28	Δ YIL056W	Δ YGR043C	Δ vhr1	Δ nqm1	Replikat 2

4 Ergebnisse

29	$\Delta YIL056W$	$\Delta YGR043C$	$\Delta vhr1$	$\Delta nqm1$	Replikat 2
30	$\Delta YIL056W$	$\Delta YGR043C$	$\Delta vhr1$	$\Delta nqm1$	Replikat 2
31	$\Delta YIL056W$	$\Delta YGR043C$	$\Delta vhr1$	$\Delta nqm1$	Replikat 2
32	$\Delta YIL056W$	$\Delta YGR043C$	$\Delta vhr1$	$\Delta nqm1$	Replikat 2
33	$\Delta YIL056W$	$\Delta YGR043C$	$\Delta vhr1$	$\Delta nqm1$	Replikat 2
34	$\Delta YIL156W$	$\Delta YHR125W$	$\Delta ubp7$	unbekannt	Replikat 2
35	$\Delta YJL129C$	$\Delta YML121W$	$\Delta trk1$	$\Delta gtr1$	Replikat 2
36	$\Delta YJR066W$	$\Delta YHR124W$	$\Delta tor1$	$\Delta ndt80$	Replikat 1
37	$\Delta YKL081W$	$\Delta YHL034C$	$\Delta tef4$	$\Delta sbp1$	Replikat 1
38	$\Delta YNL014W$	$\Delta YJL129C$	$\Delta hef3$	$\Delta trk1$	Replikat 1
39	$\Delta YNL014W$	$\Delta YPL182C$	$\Delta hef3$	unbekannt	Replikat 1
40	$\Delta YPL133C$	$\Delta YJR066W$	$\Delta rds2$	$\Delta tor1$	Replikat 1
41	$\Delta YPL133C$	$\Delta YHR158C$	$\Delta rds2$	$\Delta kel1$	Replikat 2

ORF = Leserahmen [engl.: open reading frame]

78% der identifizierten Doppelmutanten zeichneten sich durch einen einmalig aufgetretenen Genotyp aus. Eine Gene Ontology (GO) - Analyse der identifizierten Gendeletionen, welche aufzeigt an welchen Prozessen, Kompartimenten und Funktionen die jeweiligen Gene beteiligt sind, ergab die in Abbildung 7 gezeigten Klassifizierungen.

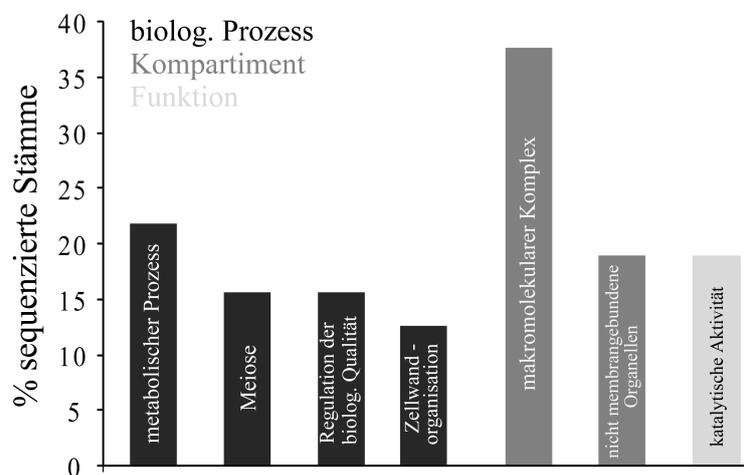


Abbildung 7: GO - Analyse haploprofizienter Doppelmutanten. Für die haploprofizienten Doppelmutanten wurde bezüglich ihrer Gendeletionen eine Gene Ontology - Analyse durchgeführt, um eine Anreicherung bestimmter Mutanten in den Bereichen biologischer Prozess, Kompartiment und Funktion zu ermitteln.

Bei 22% der Mutanten konnte jedoch eine Anreicherung einer Doppeldeletion in den beiden Genen *VHR1* und *NQM1* festgestellt werden, welche für einen

Transkriptionsfaktor (*VHR1*, Vitamin **H** - abhängiger **R**egulator 1) und ein Paralog zur Transaldolase 1 (*NQM1*, Nicht - stille [engl.: **Q**uirescent] **M**utante 1) codieren.

4.1.4 Chronologisches Altern von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

Ausgehend von der Anreicherung der heterozygoten *VHR1/NQM1* - Doppelmutante wurde im nächsten Schritt die Frage untersucht, ob sich der haploprofiziente Phänotyp aus dem kompetitiven Screen, der sich durch eine erhöhte Überlebensfähigkeit unter 6970 Doppelmutanten innerhalb der stationären Phase auszeichnete, auch auf den haploiden Genotyp übertragen lässt. Dazu wurden von den haploiden Stämmen BY4741 (Wt), $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ sowie der Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ in einem nicht-kompetitiven Experiment die Viabilitätskurven analog zu der in Abschnitt 3.12 beschriebenen Methode aufgezeichnet. Die haploide Doppelmutante wurde durch das Einfügen eines Nourseothricin-Markers (*NTC/NAT*) in den *NQM1* - Lokus der $\Delta vhr1$ - Mutante hergestellt. Der Marker wurde zuvor mit für den *NQM1* - Lokus spezifischen Primern aus dem Plasmid pAG25 amplifiziert (vgl. Abschnitt 2.8 Tabelle 14 und Abschnitt 2.9 Tabelle 15). Den Verlauf des Viabilitätstrends für die haploiden Stämme im nicht-kompetitiven chronologischen Alterungsexperiment zeigt Abbildung 8.

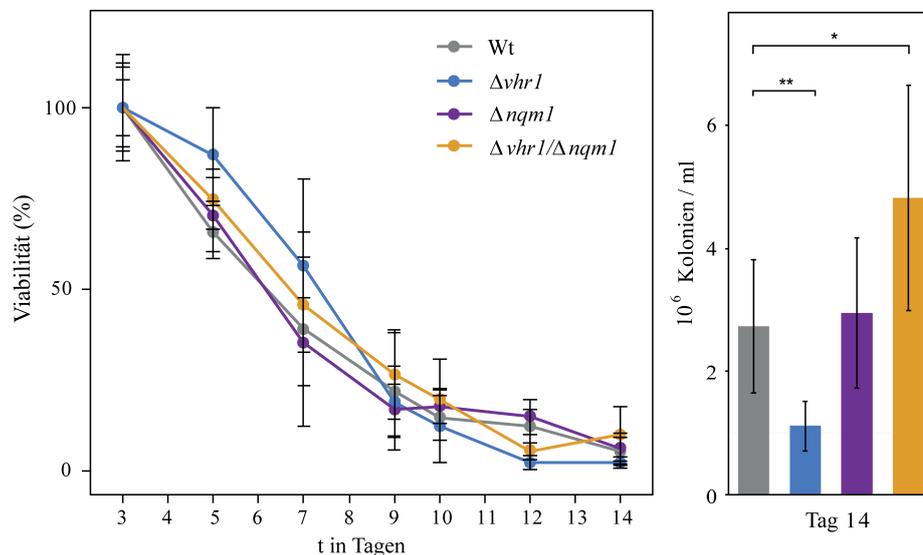


Abbildung 8: Chronologisches Altern haploider *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten. Die Viabilität wurde durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungsreihen auf SC-Agar bestimmt. Als Fehlerindikatoren wurden \pm Standardabweichungen verwendet. Rechtes Bild: Anzahl der Kolonien/ml am Tag 14. Die Werte geben die Anzahl koloniebildender Zellen (Klonogenizität). Als Fehlerindikatoren wurden die mittleren Standardfehler verwendet. n=4. Signifikanzlevel nach Student's t-test $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$.

Der Viabilitätstrend während der stationären Phase war bei allen Stämmen sehr ähnlich. Zu Beginn des Experiments waren alle Stämme relativ gleichverteilt, sodass ein Überlebensvorteil aufgrund höherer Initialzellzahl ausgeschlossen werden konnte (Tabelle 21). Im Ergebnis ließ sich dennoch erkennen, dass die haploiden Stämme im Vergleich zu den diploiden Stämmen deutlich kurzlebiger waren. Als Ursache für die deutlich kürzere Lebenspanne könnte der fehlende *LEU2* - Marker in den haploiden Stämmen infrage kommen, der bei den Diploiden durch die Herstellung der Doppelmutantenbank fester Bestandteil des Genotyps war.

Tabelle 21: Initiale Zellzahl im haploiden Alterungsexperiment

Stamm	Zellzahl (Kolonien/ml)
Wildtyp	51041667
$\Delta vhr1$	46083333
$\Delta nqm1$	48625000
$\Delta vhr1/\Delta nqm1$	47708333

Obwohl die Trends der Viabilität über die Gesamtdauer des Experiments für alle Stämme relativ ähnlich waren, zeigte sich am Ende ein divergierender Phänotyp. Im Vergleich zum Wildtyp verzeichnete die Mutante $\Delta vhr1$ signifikant die geringste ($p < 0.01$) und die Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ eine signifikant höhere Klonogenizität ($p < 0.05$; vgl. Kolonien/ml in Abbildung 8). Die Klonogenizität beschreibt die Fähigkeit neue Klone auf frischem Medium auszubilden und stellt demnach ein Maß zur Proliferationsfähigkeit der Mutanten dar. Die Mutante $\Delta nqm1$ ähnelte während des gesamten Experimentverlaufs stark dem Wildtyp.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Kombination einer Deletion in den Genen *VHR1* und *NQM1* zu einem Vorteil sowohl im kompetitiven als auch im nicht-kompetitiven Überleben in der stationären Phase führt. Abweichend vom klassischen Phänotyp einer verlängerten chronologischen Lebensdauer (d.h. Wt verstirbt zeitlich früher), manifestierte sich der Phänotyp der Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ hier als erhöhte Klonogenizität am Ende des Ausdauerexperiments.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die erhöhte Klonogenizität von haploiden $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutanten auch im heterozygoten Zustand unter nicht-kompetitiven Bedingungen zeigt. Zusätzlich sollten dadurch Effekte des Ploidiegrades ausgeschlossen werden. Dazu wurde analog zum Verfahren der haploiden Stämmen in den heterozygoten Stämmen eine Viabilitätskurve aufgezeichnet (Abbildung 9). Als

4.1 Chronologische Alterungsexperimente von *S. cerevisiae* - Mutanten

Wildtyp wurde der diploide Stamm BY4743 verwendet. Die heterozygoten Mutanten $\Delta vhr1/VHR1$ und $\Delta nqm1/NQM1$ [nachfolgend als $\Delta vhr1 +/-$ und $\Delta nqm1 +/-$ bezeichnet] sind durch Kreuzung der haploiden MAT a - Stämme $\Delta vhr1$ und $\Delta nqm1$ mit dem haploiden Wildtyp BY4742 (MAT α) entstanden (vgl. Abschnitt 3.10). Zur Generierung der heterozygoten $\Delta vhr1/VHR1//\Delta nqm1/NQM1$ - Doppelmutante [nachfolgend als $\Delta vhr1/\Delta nqm1 +/-$ bezeichnet] wurden der haploide MAT a - Stamm $\Delta vhr1$ und der haploide MAT α - Stamm $\Delta nqm1$ miteinander gekreuzt.

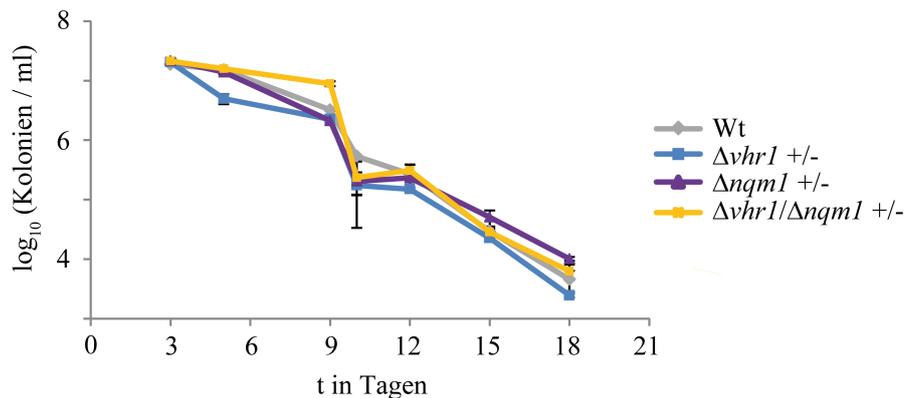


Abbildung 9: Chronologisches Altern heterozygoter *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten. Die Viabilität wurde über 18 Tage durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungsreihen auf SC-Agar bestimmt. Der Viabilitätstrend zeigt einen ähnlichen Verlauf bei allen Stämmen. Die Klonogenizität am Tag 18 ist bei der heterozygoten *NQM1* - Mutante und der *VHR1/NQM1* - Doppelmutante am stärksten ausgeprägt. Als Fehlerindikatoren wurden \pm Standardabweichungen verwendet. $n=3$.

Im Ergebnis lässt sich klar festhalten, dass sich, analog zu den haploiden Stämmen (vgl. Abbildung 8), auch in den heterozygoten Stämmen ein vom klassischen Phänotyp des chronologischen Alterns abweichender Phänotyp mit erhöhter Klonogenizität speziell der $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante zeigte. Die heterozygote $\Delta nqm1$ - Mutante zeigte ebenfalls erhöhte Klonogenizität (Abbildung 9). Demnach sind Effekte des Ploidiegrades zwischen haploiden, heterozygoten bzw. diploid homozygoten Mutanten (vgl. Powers *et al.* [104]), welche die Wirkung von *VHR1/NQM1* - Deletionen betreffen könnten, klar auszuschließen.

Wie bereits erwähnt wurden die hier beschriebenen nicht-kompetitiven Experimente zum chronologischen Altern bzw. zum Überleben in der stationären Phase im Unterschied zum ursprünglichen Haploprofizienzscreen ohne die Integration eines zusätzlichen *LEU2* - Markers im Genom der aufgeführten Deletionsstämme durchgeführt. Dass die Auxotrophie der verwendeten Stämme Auswirkungen auf ihre Lebensspanne haben kann, wurde bereits vermutet und von Mülleder *et al.* [107]

demonstriert. Durch eine Transformation der Stämme mit dem Plasmid pHLUM, welcher die Auxotrophie durch die Präsenz der Marker *LEU2*, *HIS3*, *URA3*, *MET15* aufhebt und die Stämme damit in den prototrophen Zustand versetzt, konnte der Einfluss der Auxotrophie für den Wildtyp und die Mutanten $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ ebenfalls demonstriert werden (Abbildung 10). Die haploide Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ ist dabei analog zu den, in Abbildung 8 gezeigten, haploiden Mutanten durch Integration eines *NTC* - Markers in den *NQM1* - Locus der Mutante $\Delta vhr1$ entstanden.

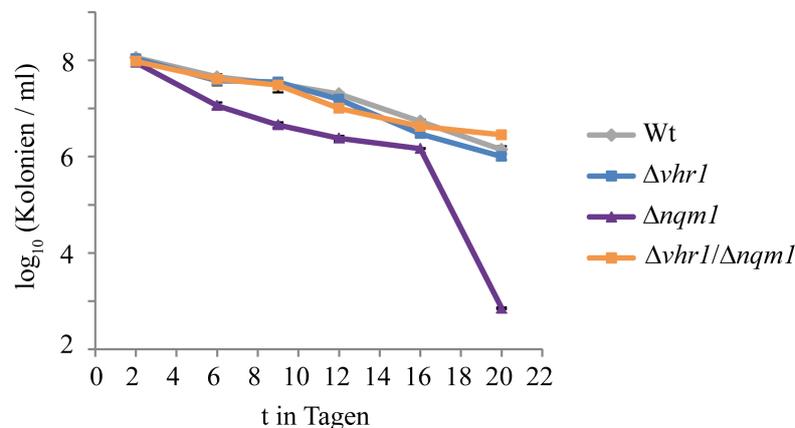


Abbildung 10: Chronologisches Altern prototropher *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten. Die haploiden Stämme Wildtyp (BY4741), $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ wurden durch Transformation mit dem Plasmid pHLUM prototroph gemacht und ihre Viabilität wurde über mehrere Tage durch Ausplattieren entsprechender Verdünnungsreihen auf SM-Agar bestimmt. Bis zum Tag 16 zeigten alle Stämme einen ähnlichen Trend, wobei die Mutante $\Delta nqm1$ eine leicht verringerte Viabilität aufwies und in den folgenden Tagen zunehmend an Viabilität verlor. Die Klonogenizität der Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ erreichte zum Ende des Experiments erneut den höchsten Wert. Als Fehlerindikatoren wurden \pm Standardabweichungen verwendet. $n=3$.

Die Auswirkung einer Prototrophie des Wildtyps und der Deletionsstämmen wurde deutlich sichtbar (Abbildung 10). Bei allen Stämmen zeigte sich, im Vergleich zu den haploiden bzw. heterozygot auxotrophen Stämmen (vgl. Abbildung 8, Abbildung 9), eine deutlich verlängerte Lebensspanne in den prototrophen Stämmen (~ 20 Tage bei prototrophen, $\sim 14-18$ Tage bei auxotrophen). In allen Stämmen war bis Tag 16 eine hohe Viabilität und damit relativ vergleichbare Anzahl an Kolonien/ml zu verzeichnen. Die Mutante $\Delta nqm1$ hatte während des Experiments eine etwas geringere Viabilität und verlor diese zusätzlich rapide nach Tag 16, während die anderen Stämme weiterhin relativ stabil waren bzw. nur langsam an Viabilität verloren. Die Klonogenizität der Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ erreichte erneut den höchsten Wert im Vergleich zu den anderen Stämmen.

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass sich der Phänotyp der Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$, wenn auch in der Ausprägung etwas variierend, sowohl im kompetitiven als auch im nicht-kompetitiven Wettbewerb, im haploiden und heterozygoten Zustand sowie im auxo- bzw. prototrophen Zustand durch eine erhöhte Klonogenizität manifestiert und dadurch einen Überlebensvorteil innerhalb der stationären Phase bzw. bei einem, unter diesen Umständen auftretenden, Nährstoffmangel bietet.

4.2 Charakterisierung von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

4.2.1 Zuckerphosphatprofil von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

Die bisher relativ unerforschte Transaldolase *NQM1* ist ein Paralog des im PPP aktiven Enzyms Transaldolase 1 (*TAL1*) [122]. Da bereits bekannt ist, dass Deletionen von PPP-Enzymen unter gewissen Umständen ein charakteristisches metabolisches Profil aufweisen [6, 8], sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich haploide bzw. ihre korrespondierenden diploid heterozygoten $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutanten ebenfalls durch ein charakteristisches PPP-Metabolitenverteilungsprofil auszeichnen. Dadurch sollten später Rückschlüsse über die Funktion bzw. funktionelle Lokalisation von *VHR1* und *NQM1* getroffen werden können. Neben der Analyse der PPP - assoziierten Zuckerphosphate wurden zusätzlich die glykolytischen Zuckerphosphate quantifiziert. Die Zuckerphosphate wurden nach der in Abschnitt 3.14/3.15 beschriebenen Methode extrahiert und quantifiziert. Die resultierenden Konzentrationsverhältnisse wurden als Relativkonzentrationen (Ratio Mutante/Wildtyp) in Form einer Heatmap angegeben.

Die Quantifizierung der Zuckerphosphate aus Glycolyse und PPP ergab für die *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten, im Vergleich zum Wildtyp, eine Vielzahl an veränderten Zuckerphosphatkonzentrationen (Abbildung 11). Im allgemeinen Vergleich zwischen den haploiden und heterozygoten *VHR1* bzw. *NQM1* - Mutanten fiel auf, dass die Profile, bis auf wenige Ausnahmen, invertiert zu sein schienen, d.h. verringerte Konzentrationen im haploiden Genotyp zeigten sich als tendenziell erhöhte Konzentrationen im heterozygoten Zustand.

4 Ergebnisse

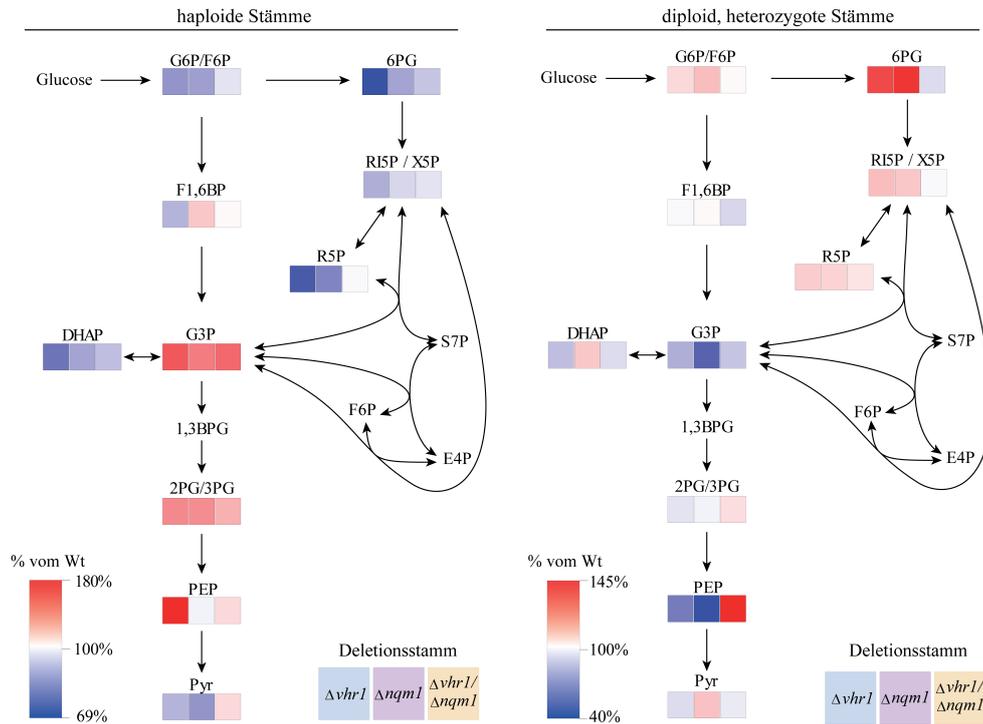


Abbildung 11: Zuckerphosphatprofil von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten. Die Zuckerphosphatprofile von haploiden Wildtyp (BY4741), $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutanten (linkes Bild) sowie die Verteilungsprofile der korrespondierenden diploid heterozygoten Mutanten (rechtes Bild) sind dargestellt. Die Metabolitkonzentrationen wurden auf den Wildtyp normalisiert und durch Farbkodierung wiedergegeben. Die Messung erfolgte in Triplikaten; Glucose-6-phosphat/Fruktose-6-phosphat (G6P/F6P); Fruktose-1,6-Bisphosphat (F1,6BP); Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P); Dihydroxyacetonphosphat (DHAP); 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3BPG); 2-Phosphoglycerat/3-Phosphoglycerat (2PG/3PG); Phosphoenolpyruvat (PEP); Pyruvat (Pyr); 6-Phosphogluconat (6PG); Ribulose-5-phosphat/Xylulose-5-phosphat (RI5P/X5P); Ribose-5-phosphat (R5P); Sedoheptulose-7-phosphat (S7P); Erythrose-4-phosphat (E4P). Die Metaboliten S7P, E4P, 1,3BPG wurden nicht quantifiziert und die Metaboliten G6P/F6P, 2PG/3PG, RI5P/X5P wurden als Summe quantifiziert.

Im Falle der haploiden Mutante $\Delta vhr1$ konnten für die Zuckerphosphate der oberen Glycolyse (Glucose-6-phosphat/Fruktose-6-phosphat (G6P/F6P), Fruktose-1,6-Bisphosphat (F1,6BP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)) sowie der unteren Glycolyse (Pyruvat (Pyr)) als auch für die Zuckerphosphate des oxidativen bzw. des nicht-oxidativen Teils des PPP (6-Phosphogluconat (6PG), Ribulose-5-phosphat/Xylulose-5-phosphat (RI5P/X5P), Ribose-5-phosphat (R5P)), um bis zu 43% verringerte Konzentrationen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurden für die zentralen bzw. unteren glykolytischen Zuckerphosphate (Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P), 2-Phosphoglycerat/3-Phosphoglycerat (2PG/3PG), Phosphoenolpyruvat (PEP)) Konzentrationen festgestellt, die bis zu 65% über dem Wildtypellevel lagen. Die haploide Mutante $\Delta nqm1$ zeigte ein relativ ähnliches Profil, auch wenn

die erhöhte PEP-Konzentration der $\Delta vhr1$ - Mutante bei der $\Delta nqm1$ - Mutante nicht beobachtet wurde. Das Zuckerphosphatprofil der haploiden Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ war weniger stark ausgeprägt und spiegelte zusammenfassend, bis auf die leicht erhöhte Konzentration an G3P, eher das Profil des Wildtyps wieder. Die Profile der heterozygoten Mutanten waren im Vergleich zu den haploiden prinzipiell verschieden, auch wenn das Profil der Mutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ +/- weitestgehend erneut homolog zum Profil des Wildtyps war. Heterozygote Deletionen von *VHR1* oder *NQM1* zeigten erhöhte Konzentrationen bei den PPP-Intermediaten 6PG, RI5P/X5P, R5P sowie bei G6P/F6P, welche bei der Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ +/- nicht auftraten. Dieser Phänotyp zeigte sich ebenfalls für die Zuckerphosphate der unteren Glycolyse, bei denen die Profile von $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ +/- eher gegensätzlich zu den Profilen von *VHR1* +/- oder *NQM1* +/- waren, was beispielsweise anhand des Metabolits PEP erkennbar war. Für einzelne Metaboliten (DHAP/Pyruvat) konnte auch ein gegenläufiger Trend bezüglich der Metabolitkonzentrationen in heterozygoten *VHR1* oder *NQM1* - Mutanten identifiziert werden. In diesen Fällen tendierte das Profil der heterozygoten Doppelmutante eher zum Profil der Mutante $\Delta vhr1$ +/-.

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass sowohl haploide als auch heterozygote Deletionen in *VHR1* oder *NQM1* die Konzentrationen der Zuckerphosphate aus Glycolyse und PPP beeinflussen, und dass eine Doppeldeletion in *VHR1* und *NQM1* diese Phänotypen im Trend teilweise widerspiegelt, in anderen Fällen jedoch durchaus reziproke Konzentrationstrends zu den *VHR1* oder *NQM1* - Mutanten aufweisen kann. Über die genaue Funktion bzw. funktionelle Lokalisation von *VHR1* und *NQM1* konnten anhand dieser Analyse noch keine definitiven Aussagen getroffen werden. Anhand der Zuckerphosphatprofile kann jedoch angenommen werden, dass Deletionen in *VHR1* und *NQM1* einen gewissen Einfluss auf die Intermediate des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels (Glycolyse/PPP) ausüben.

4.2.2 Alditolprofile von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

Neben den Zuckerphosphaten wurden in den Mutanten zusätzlich die Polyole, speziell die Alditole, quantifiziert. Als Polyole bezeichnet man eine Gruppe organischer Verbindungen, welche sich durch das Vorhandensein mehrerer Hydroxylgruppen (OH^-) auszeichnet. Eine Untergruppe der Polyole, die Alditole, sind azyklische

Polyole, welche sich strukturell als Reduktionsprodukte von Kohlenhydraten ableiten. Sie werden umgangssprachlich auch als Zuckeralkohole bezeichnet. Die relative Quantifizierung der Alditole innerhalb der Mutanten wurde nach der in Abschnitt 3.16 beschriebenen Methode durchgeführt und zeigte weitere Auswirkungen der *VHR1* bzw. *NQM1* - Deletionen (Abbildung 12).

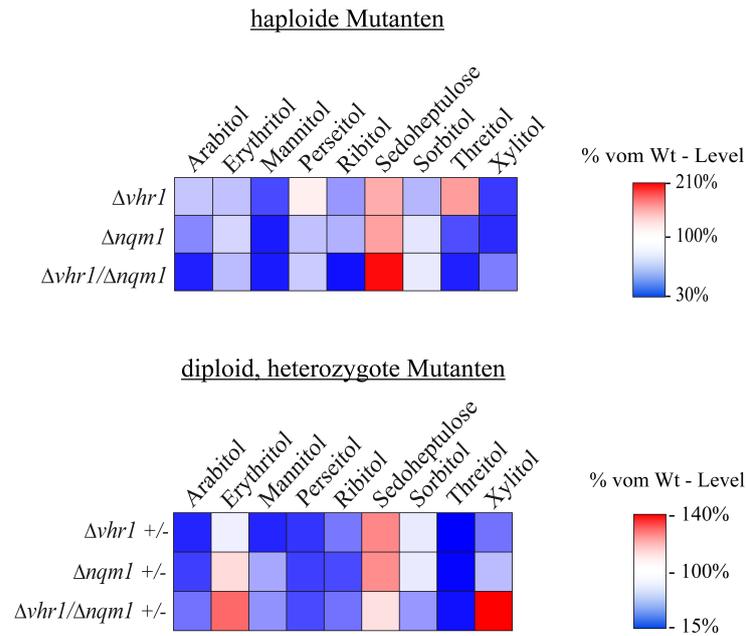


Abbildung 12: Alditolprofil von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten. Die Alditolprofile der haploiden $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$, $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutanten (oberes Bild) sowie deren korrespondierende heterozygote Mutanten (unteres Bild). Die Metabolitkonzentrationen wurden auf den Wildtyp (BY4741/BY4743) normalisiert und durch Farbkodierung wiedergegeben. Erhöhte Konzentrationen (rot), verringerte Konzentrationen (blau) n=3.

Bei den haploiden Mutanten $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ wurde beobachtet, dass die relativen Konzentrationen der Alditole im Vergleich zum Wildtyp, bis auf wenige Ausnahmen, verringert waren. Die Alditolkonzentrationen variierten dabei von leichten Veränderungen ($\sim 80\%$ vom Wt-Level) bei Erythritol, Perseitol und Sorbitol bis zu starken Veränderungen ($\sim 30\%$ vom Wt-Level) bei Arabitol, Mannitol, Ribitol und Xylitol. Während die Stärke der Konzentrationsänderungen bei Mannitol und Xylitol für alle Mutanten relativ homogen war, zeigte sich bei Arabitol und Ribitol, dass die geringen Alditollevel von $\Delta vhr1$ über $\Delta nqm1$ bis zur $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutante graduell anstiegen. Erhöhte Level wurden für alle Mutanten bei Sedoheptulose verzeichnet, wobei die höchste Konzentration ($\sim 110\%$ über Wt-Level), analog zur geringen Konzentration an Arabitol, bei der

$\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutante beobachtet wurde. Für $\Delta vhr1$ konnten zusätzlich leicht erhöhte Threitolkonzentrationen nachgewiesen werden, während bei der $\Delta nqm1$ - und der $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutante gegenläufig verringerte Konzentrationen auftraten. Bei den heterozygoten Mutanten waren die Konzentration der meisten Alditole ebenfalls verringert. Im Speziellen zeigten sich bei Arabitol, Perseitol, Ribitol und Threitol sowie vereinzelt ($\Delta vhr1$ - Mutante) bei Mannitol und Xylitol die geringsten Konzentrationen ($\sim 15\%$ vom Wt-Level). Ein gradueller Anstieg der Alditolkonzentration konnte von $\Delta vhr1$ über $\Delta nqm1$ bis zur $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutante bei Erythritol und Xylitol beobachtet werden. Dabei verzeichnete die $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutante die höchste Konzentration ($\sim 40\%$ über Wt-Level). Bei Sedoheptulose zeigte sich für die heterozygoten Einzelmutanten $\Delta vhr1$ und $\Delta nqm1$ ein ähnliches Bild wie bei den haploiden Stämmen. Die relative Konzentration von Sedoheptulose war jedoch bei der heterozygoten $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante geringer als im haploiden Zustand. Die Konzentrationen waren nahezu vergleichbar zum Wildtyp. Die Alditolprofile verdeutlichen, dass sich Deletionen von *VHR1* und *NQM1* neben den Zuckerphosphaten auch auf die relative Verteilung der Alditole auswirken können. Die Alditole waren bis auf wenige Ausnahmen in allen Stämmen tendenziell geringer konzentriert als im Wildtyp.

4.2.3 Nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen induzieren die Expression von *NQM1*

Die Kristallstruktur von *NQM1* wurde im Jahr 2008 durch Huang *et al.* [122] charakterisiert. Parallel dazu wurde für *NQM1* die klassische Transaldolasenreaktion der reversiblen Umsetzung von Sedoheptulose-7-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu Erythrose-4-phosphat und Fructose-6-phosphat *in vitro* nachgewiesen. Im Gegensatz zur Transaldolase *TAL1* zeigte *NQM1* kein typisches Zuckerphosphatverteilungsprofil, welches u.a. durch eine Akkumulation des Metabolits Sedoheptulose-7-phosphat gekennzeichnet wäre [6]. Dies deutete darauf hin, dass *NQM1* nicht direkt an der Funktion des PPP beteiligt ist. Auch wenn *NQM1* prinzipiell in der Lage ist die typische Transaldolasereaktion zu katalysieren, ist unter normalen Wachstumsbedingungen eine funktionelle Tal1p ausreichend, um die Funktion des PPP zu gewährleisten.

Von Costenoble *et al.* [123] wurde bereits indirekt vermutet, dass die Funktion von *NQM1* womöglich unter anderen Wachstumsbedingungen relevant sei. Daraufhin wurde mittels qRT-PCR untersucht, ob sich die mRNA Expression der beiden Transaldolasen *TAL1* und *NQM1*, unter sich verändernden Nährstoffbedingungen, ähnlich bzw. abweichend verhält. Dazu wurden der Wildtyp sowie die Mutanten $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$, analog zu der in Abschnitt 3.21 beschriebenen Methode, in SC-Glucose, SC-Galactose, SC-Ethanol und SC-Glycerol kultiviert.

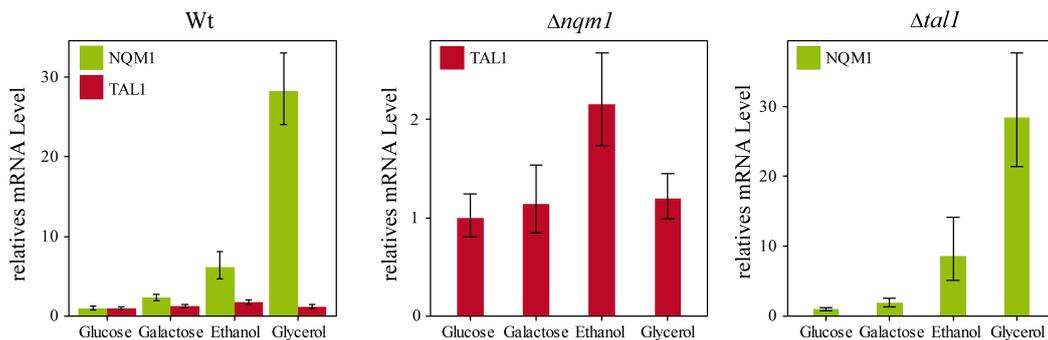


Abbildung 13: Induktion von *NQM1* unter verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Expression von *NQM1* und *TAL1* im Wildtyp (BY4741), $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$ unter Verwendung verschiedener Kohlenstoffquellen (Glucose, Galactose, Ethanol, Glycerol). Die Expression von *NQM1* wird unter Galactose und bei nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol, Glycerol) induziert. Die Expression von *TAL1* wird nur unter Ethanol leicht induziert. Die qRT-PCR-Proben wurden in Flüssigmedium angezogen, welches mit den angegebenen Kohlenstoffquellen versetzt war. Die Zellen wurden in der mid-log Phase ($OD_{600} = 0.8 - 1.0$) geerntet. $n=3$, Fehler = \pm Stabw.

Eine Verschiebung der Zellen von fermentierbaren (Glucose, Galactose) auf nicht-fermentierbare (gluconeogenetische; Ethanol, Glycerol) Kohlenstoffquellen führte im Wildtyp und der Mutante $\Delta tal1$ zu einer graduell ansteigenden Induktion der *NQM1* - Expression (Abbildung 13). Die Expressionlevel stiegen dabei um das 30-fache an (Abbildung 13, Bild rechts/links). Die Expressionslevel von *TAL1* waren unter allen Wachstumsbedingungen relativ konstant. Nur bei Ethanol stieg die Expression von *TAL1* um das Zweifache an (Abbildung 13, Bildmitte). Interessanterweise wurde die *NQM1* - Expression von einer *TAL1* - Deletion und *vice versa* die *TAL1* - Expression von einer *NQM1* - Deletion nicht beeinträchtigt (vgl. $\Delta tal1$ und $\Delta nqm1$ in Abbildung 13, mittleres- und rechtes Bild).

Durch diese Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass die Expression von *NQM1* bevorzugt unter anderen Wachstumsbedingungen, speziell bei nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol, Glycerol), induziert wird. Die Induktion von *NQM1* war dabei unabhängig von der An-/ bzw. Abwesenheit ihres PPP-Paralogs *TAL1*, bei welchem tendenziell keine Änderungen in der Expression unter dem Einfluss

der verschiedenen Kohlenstoffquellen zu verzeichnen waren (außer einer moderat gesteigerten Expression in SC-Ethanol).

4.2.4 Kalorierestriktion induziert die Expression von *NQM1*

Da die Transaldolase *TAL1* im Normalzustand ein relativ hochaktives Enzym ist, deuten die qRT-PCR Ergebnisse der Induktion von *NQM1* unter nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen darauf hin, dass die Regulation der Expression von *NQM1* nicht von der Gesamtzymaktivität der Transaldolase abhängt, sondern dass *NQM1* ein durch Glucose reprimiertes Gen darstellt. Daraufhin wurden die Effekte einer Kalorierestriktion auf das Expressionslevel von *TAL1* und *NQM1* im Wildtyp, der Mutante $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$ untersucht. Die Stämme wurden dazu, wie in Abschnitt 3.21 beschrieben, variierenden Glucosekonzentrationen von 2%, 0.5%, 0.05% ausgesetzt.

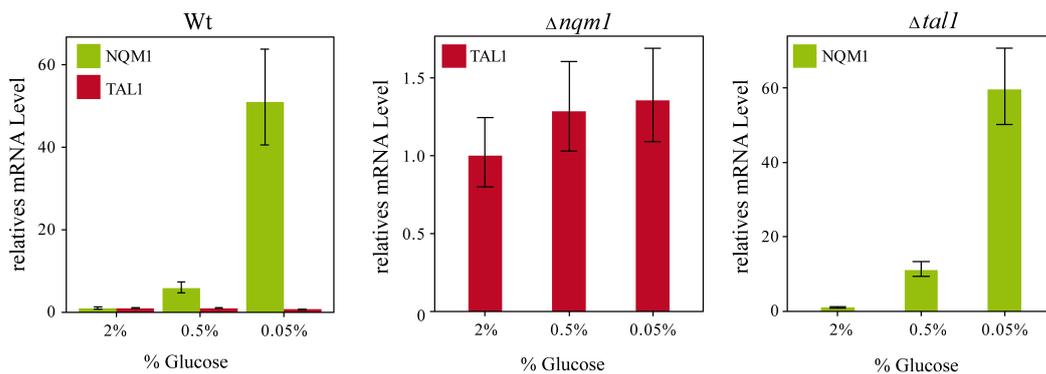


Abbildung 14: Induktion der *NQM1* - Expression nach Kalorierestriktion. Die Expression von *NQM1* und *TAL1* im Wildtyp (BY4741), $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$ bei variierenden Glucosekonzentrationen von 2%, 0.5% und 0.05%. Die Expression von *NQM1* wird bei sinkender Glucosekonzentration stark induziert, während sich die *TAL1* - Expression nur minimal erhöht. Die Kulturen wurden in SC + 2% Glucose vorkultiviert und nach Erreichen der mid-log Phase ($OD_{600} = 0.8 - 1.0$) in SC + 0.5% Glucose bzw. 0.05% Glucose überführt und für 1 h inkubiert, bevor die Proben für die qRT-PCR gesammelt wurden. n=3, Fehler = \pm Stabw.

Bei einer Verringerung der Glucosekonzentration von 2% über 0.05% auf 0.05% zeigte sich ein ~ 50 -facher Anstieg der *NQM1* - Expression im Wildtyp und der Mutante $\Delta tal1$ (Abbildung 14, Bild links/rechts). Im Gegensatz dazu waren die *TAL1* - Expressionslevel bei den verschiedenen Glucosekonzentrationen relativ konstant und zeigten zudem keine Wirkung auf die Expressionslevel von *NQM1*. Dies deutete, analog zur Kohlenstoffquellenabhängigen Induktion von *NQM1*, darauf hin, dass

die Expression von *NQM1* unabhängig von *TAL1* reguliert ist, und dass nur *NQM1* und nicht *TAL1* durch Glucose in ihrer Expression reprimiert wird.

4.2.5 Induktion der *NQM1* - Expression in Abhängigkeit von *VHR1*

Im Ergebnis des Haploprofizienzscreens wurde eine Anreicherung der heterozygoten *VHR1/NQM1* - Doppelmutante im kompetitiven Wettbewerb beobachtet. Da *VHR1* für einen Transkriptionsfaktor codiert, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob und inwiefern sich *VHR1* und *NQM1* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gegenseitig beeinflussen. Dazu wurden, analog zu den Abschnitten 4.2.3 und 4.2.4, qRT-PCR-Analysen vom Wildtypstamm (BY4741) und der Mutante $\Delta vhr1$ unter dem Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen sowie unter Kalorierestriktion durchgeführt.

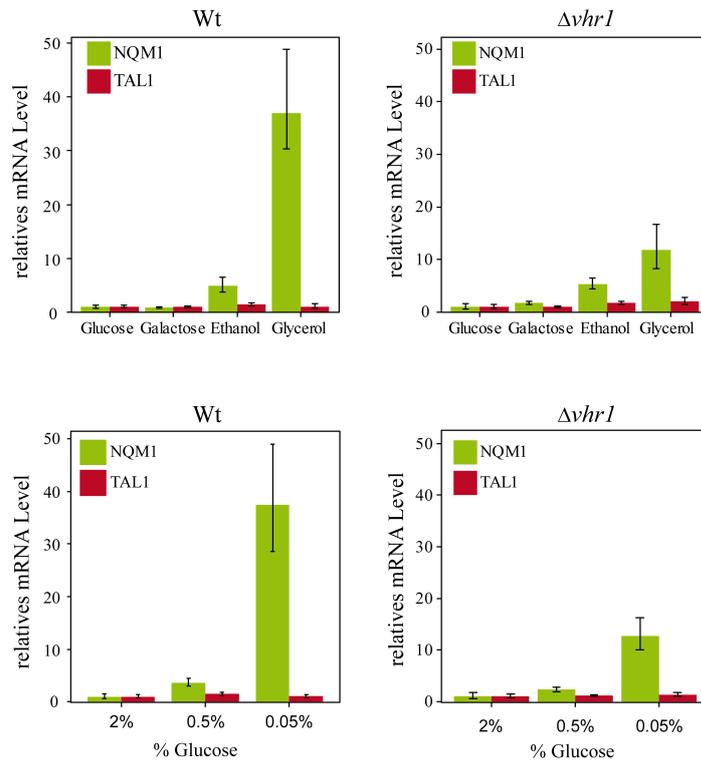


Abbildung 15: *VHR1* - abhängige Induktion der *NQM1* - Expression. Induktion von *NQM1* unter nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (obere Bilder) sowie unter Kalorierestriktion (untere Bilder) im Wildtyp (BY4741) und der Mutante $\Delta vhr1$. Die Induktion von *NQM1* ist aufgrund der *VHR1* - Deletion nicht vollständig reprimiert, aber stark reduziert. Die Kulturen für die qRT-PCR-Analyse wurden in Flüssigmedien angezogen, welche mit den angegebenen Kohlenstoffquellen versetzt waren bzw. die angegebenen Glucosekonzentrationen beinhaltenen. Für die Analysen der Kohlenstoffquellen wurden die Zellen in der mid-log Phase ($OD_{600} = 0.8 - 1.0$) geerntet. Für die Analysen zur Kalorierestriktion wurden die Kulturen in SC + 2% Glucose vorkultiviert und nach Erreichen der mid-log Phase in SC + 0.5% Glucose bzw. 0.05% Glucose überführt und für 1 h inkubiert, bevor die Proben für die qRT-PCR gesammelt wurden. $n=3$, Fehler = \pm Stabw.

Über qRT-PCR-Analysen konnte demonstriert werden, dass eine Deletion von *VHR1* die Induktion von *NQM1* unter verschiedenen Kohlenstoffquellen bzw. unter Kalorierestriktion nicht vollständig reprimiert, aber auffällig stark reduziert (Abbildung 15; Expression von *NQM1* ist auf $\sim 1/4$ des Wt-Levels reduziert). Das impliziert zusätzlich, dass *NQM1* nicht ausschließlich durch *VHR1* reguliert ist. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind noch andere Transkriptionsfaktoren an der Regulation von *NQM1* beteiligt.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen lassen sich die Resultate der qRT-PCR-Analysen in Hinblick auf die *NQM1* - Expression wie folgt zusammenfassen: die Expression von *NQM1* wird unter nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol, Glycerol) sowie unter Kalorierestriktion induziert. Die Induktion von *NQM1* ist

dabei unabhängig von ihrem Paralog *TAL1*, aber in ihrer Ausprägung stark von *VHR1* abhängig.

4.2.6 Osmotischer Stress induziert die Expression von *NQM1*

In früheren Studien wurde bereits berichtet, dass die zelluläre Antwort auf osmotischen Stress über die Gene *HOG1-HOT1* vermittelt wird. Sie werden als Hauptkomponenten der durch osmotischen Stress induzierten genregulatorischen Antwort der Zelle gesehen und können die Expression von *NQM1* beeinflussen [124]. Durch Northern Blot - Analysen konnte in diesem Fall klar gezeigt werden, dass *NQM1* in Wildtypzellen unter hohen NaCl-Konzentrationen induziert wird, und dass eine Deletion von *HOG1* die *NQM1* - Expression um bis zu 75% verringern kann [124].

Um zu klären, ob sich die genetische Interaktion von *VHR1* und *NQM1* durch Änderungen im osmotische Potential beeinflussen lässt, wurde der Verlauf der Osmolalität des Nährmediums im nicht-kompetitiven Alterungsexperiment der haploiden Stämme (Abschnitt 4.1.4, Abbildung 8), nach der in Abschnitt 3.17 beschriebenen Methode, parallel dazu aufgezeichnet.

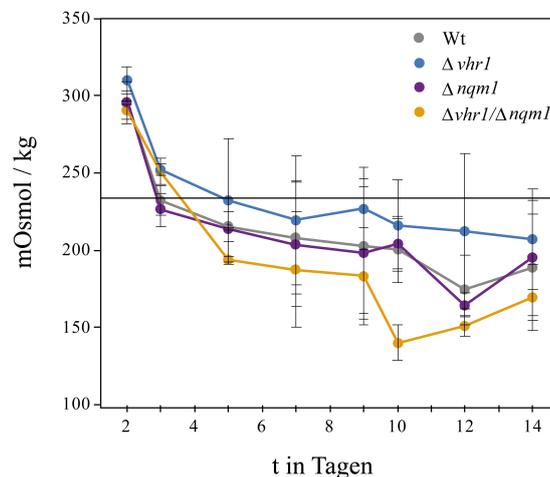


Abbildung 16: Osmolalitätstrend bei chronologischem Altern. Die Osmolalität wurde über die Methode der Gefrierpunktniedrigung in Triplikaten bestimmt. Die durchgezogene, horizontale graue Linie bei 233.75 mOsmol/kg gibt die Osmolalität des SC-Mediums an (hefefreies Medium). Alle abgebildeten Stämme zeigen eine hohe Osmolalität zu Beginn des Experiments, welche über die Zeit unter den Nullwert des SC-Mediums sank und dann bis zum Ende des Experiments relativ konstant blieb. Der Wildtyp (Wt) und die Mutante $\Delta nqm1$ zeigten einen ähnlichen Verlauf. Für die Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ wurde der stärkste und für die Mutante $\Delta vhr1$ der geringste Abfall der Osmolalität im Medium beobachtet. $n=3$, Fehler = \pm Stabw.

Der Vergleichswert des SC-Mediums lag vor Zugabe der Kulturen bei 233.75 mOsmol/kg. Nachdem die Kulturen angeimpft wurden, stieg der Osmolalitätswert innerhalb von 48 h in allen Stämmen gleichmäßig auf 300-320 mOsmol/kg, was vermutlich auf die Freisetzung intrazellulärer Metaboliten aufgrund des Absterbens von Zellen zurückzuführen ist (Abbildung 16). Im weiteren Verlauf sank die Osmolalität gleichmäßig bis zum Ende des Experiments. Hier kann spekuliert werden, ob die Ursache dafür ein Rückgang der Metabolitenkonzentration im Medium war, welche als Nährstoffe für die noch vitalen Hefezellen dienten. Da in diesem Zusammenhang keine Quantifizierung der extrazellulären Metaboliten vorgenommen wurde, bleiben diese Vermutungen vorerst spekulativ. Die Osmolalität verringerte sich im Medium der $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante schneller und im Endeffekt auch stärker als bei den anderen Stämmen. Die $\Delta vhr1$ - Mutante zeigte ein besonders langsames Absinken der Osmolalität. Dabei ähnelte die Osmolalität stark der initialen Osmolalität des hefefreien Mediums. Dies deutet auf metabolische Unterschiede zwischen den Stämmen hin, was auch durch die vorangegangenen Metabolitenanalysen gestützt wurde. Für den Wildtyp und die Mutante $\Delta nqm1$ wurde ein relativ ähnlicher Osmolalitäts-trend beobachtet.

Zusammengefasst zeigte der Osmolalitäts-trend bei allen Stämmen keine allzu großen Abweichungen zur initialen Osmolalität des hefefreien SC-Mediums, auch wenn es zwischendurch zu leichten Schwankungen kam (Tag 10 bei $\Delta vhr1/\Delta nqm1$, Tag 12 bei Wt und $\Delta nqm1$). Aus diesem Grund kann spekuliert werden, dass die Änderungen des osmotischen Potentials im Kulturmedium keinen direkten Einfluss auf die Lebensspanne von $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Mutanten ausüben.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich für die Stämme Wildtyp (BY4741), $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$ sichtbare Phänotypen bei Kontakt mit Salz-, Schwermetall- und Osmostress auslösenden Reagenzien ergeben. Dazu wurden neben den Einzelmutanten auch Doppel- bzw. Tripelmutanten von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* im haploiden sowie im diploid heterozygoten Zustand untersucht. Die Herstellung der Mutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ erfolgte durch Integration eines *NTC* - Markers aus pAG25 in den *NQM1* - Lokus der Mutante $\Delta vhr1$. Für die Mutante $\Delta vhr1/\Delta tal1$ wurde ein Hygromycin-Marker aus pAG32 in den *TAL1* - Lokus der Mutante $\Delta vhr1$ integriert, während dieser für die Mutante $\Delta nqm1/\Delta tal1$ in den *TAL1* - Lokus der Mutante $\Delta nqm1$ integriert wurde (vgl. Abschnitte 2.8; 2.9; 3.9). Für die Tripelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ wurde zusätzlich ein Hygromycin-Marker in den

4 Ergebnisse

TAL1 - Lokus der Mutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ integriert (vgl. Abschnitte 2.8; 2.9; 3.9). Zur phänotypischen Analyse wurden sogenannte Tropftests angewandt. Dabei wird die zu untersuchende Substanz in den angegebenen Konzentrationen dem SC-Agar beigefügt und die zu untersuchenden Stämme, ausgehend von einem $OD_{600} = 2.0-3.0$, in einer Verdünnungsreihe (1:5 Verd.) auf SC-Agar getropft.

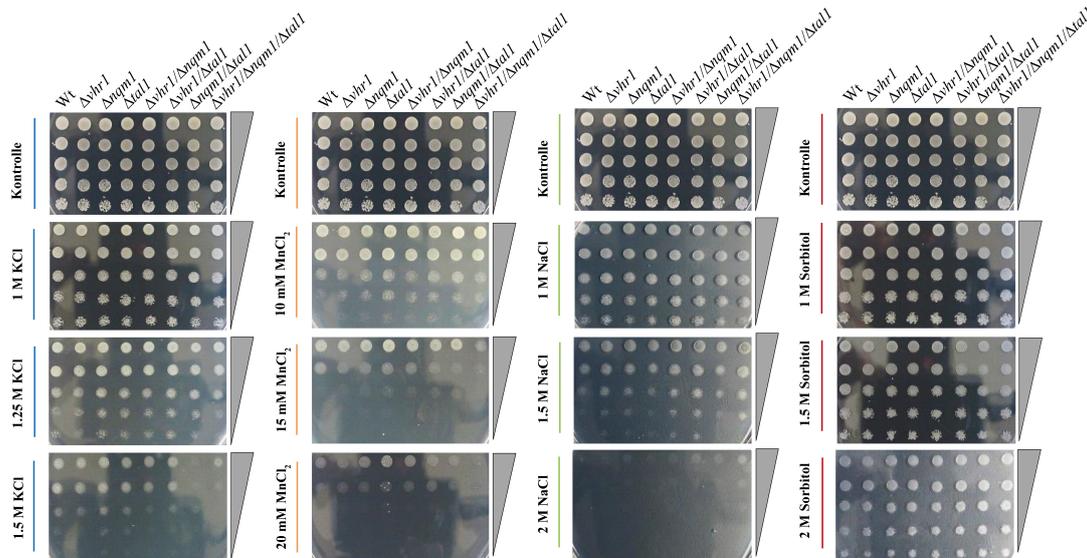


Abbildung 17: Salz-/Osmostresstests von haploiden *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz von haploiden *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten bei Salz- (KCl, NaCl), Schwermetall- ($MnCl_2$) sowie osmotischen Stress (Sorbitol). Die Stresstoleranz ist gegenüber allen Substanzen weitestgehend homogen. Bei 1.5M KCl zeigten die Mutanten $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$ eine minimal erhöhte Resistenz, wobei die korrespondierende Doppelmutante $\Delta nqm1/\Delta tal1$, wie auch die Tripelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ sensibler wurden. Bei 1.5M NaCl wirkten die Mutanten $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ und $\Delta vhr1/\Delta tal1$ leicht resistenter, wobei sich dieser Unterschied bei höheren NaCl-Konzentrationen nicht weiter ausprägte. Die Reaktionen auf $MnCl_2$ und Sorbitol waren phänotypisch neutral. Die Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen dem SC-Agar beigefügt und die Kulturen in einer Verdünnungsreihe aufgetragen.

Die Stresstoleranztests demonstrierten, dass die getesteten Substanzen zum Großteil keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten haploiden Deletionsstämme hatten (Abbildung 17). Nur bei einer Konzentration von 1.5 M KCl ließ sich eine schwache Resistenz bei den Mutanten $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$ erkennen. Umgekehrt manifestierte sich die Doppeldeletion der beiden Transaldolasen $\Delta nqm1/\Delta tal1$ sowie eine Tripeldeletion von $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ als gesteigerte Sensibilität gegenüber KCl. Bei 1.5 M NaCl war ebenfalls eine minimal gesteigerte Resistenz von $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$, $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ sowie $\Delta vhr1/\Delta tal1$ bei gleichzeitiger leichter Sensibilität von $\Delta tal1$ und $\Delta nqm1/\Delta tal1$ erkennbar.

4.2 Charakterisierung von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

Im diploid heterozygoten Zustand zeigte sich für die getesteten Substanzen kein erkennbarer Phänotyp der Mutanten. Alle Mutanten zeigten ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum (Abbildung 18).

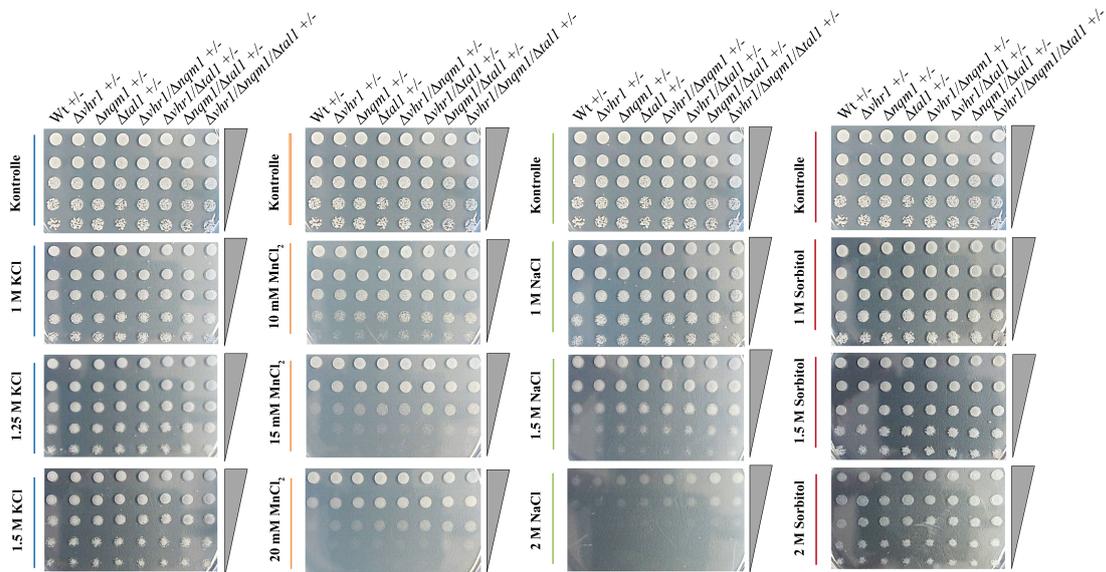


Abbildung 18: Salz-/Osmostresstests von diploid heterozygoten *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz von diploid heterozygoten *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten bei Salz- (KCl, NaCl), Schwermetall- (MnCl₂) sowie osmotischen Stress (Sorbitol) wurde untersucht. Die Stresstoleranz ist gegenüber allen Substanzen weitestgehend homogen. Die Mutanten zeigten ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstum. Die Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen dem SC-Agar beigefügt und die Kulturen in einer Verdünnungsreihe aufgetragen.

Die Stresstoleranztests mit verschiedenen Salz-, Schwermetall- sowie Osmostress auslösenden Substanzen haben gezeigt, dass sowohl haploide als auch diploid heterozygote *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten phänotypisch weitestgehend unauffällig waren (Abbildung 17/18). Stellenweise zeigten sich dennoch, wenn auch sehr schwach, gesteigerte Resistenzen bzw. Sensibilitäten (vgl. Abbildung 17 bei 1.5 M KCl / 1.5 M NaCl). Die Stresstoleranztests mit haploiden bzw. diploid heterozygoten Mutanten wurden zusätzlich unter Verwendung alternativer Kohlenstoffquellen (Galactose, Ethanol, Glycerol) sowie mit stationären Kulturen (3 Tage Präinkubation) durchgeführt. Im Ergebnis konnten keine Phänotypen beobachtet werden, die auf einen Einfluss der Kohlenstoffquelle bzw. auf eine veränderte Stresstoleranz stationärer Kulturen hinwiesen. Aus diesen Gründen und der eingangs angesprochen Korrelation zu früheren Studien [124] wurde weiterhin untersucht, ob der Kontakt mit osmotisch wirksamen Substanzen prinzipiell zur Induktion der *NQM1* - Expression

führt und ob diese Induktion ebenfalls, analog zur Induktion von *NQM1* unter verschiedenen Kohlenstoffquellen bzw. bei Kalorierestriktion, vom Transkriptionsfaktor *VHR1* abhängig ist.

Dazu wurde die Expression von *NQM1* über qRT-PCR-Analysen im Wildtyp (BY4741) und in der Mutante $\Delta vhr1$ nach Zugabe von 1.5 M NaCl bzw. 2 M Sorbitol (bei mid-log Phase $OD_{600} = 0.8 - 1.0$) zeitlich verfolgt.

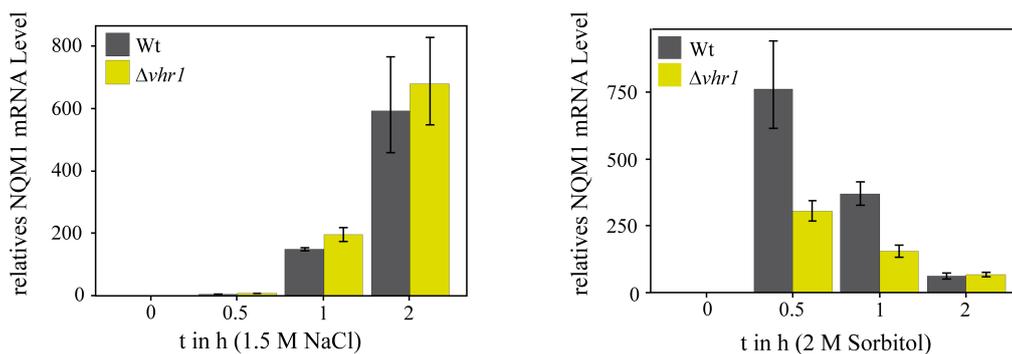


Abbildung 19: Induktion von *NQM1* unter Salz- bzw. osmotischem Stress. Expression von *NQM1* bei Salz- bzw. osmotischen Stress im Vergleich zwischen Wildtyp (BY4741) und der Mutante $\Delta vhr1$. Der zeitliche Verlauf der *NQM1* - Expression im Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$ nach Zugabe von NaCl bzw. Sorbitol wurde über den Zeitraum 0 h, 0.5 h, 1 h, 2 h verfolgt. Nach Zugabe von NaCl zeigten der Wildtyp und die Mutante $\Delta vhr1$ eine ansteigende Expression von *NQM1* (linkes Bild). Nach Zugabe von Sorbitol zeigte sich eine zeitlich frühere Induktion der *NQM1* - Expression als bei NaCl, jedoch war die Stärke der Expression in der Mutante $\Delta vhr1$ gegenüber dem Wildtyp verringert (rechtes Bild). Die Kulturen wurden in SC bis zu einem $OD_{600} = 0.8 - 1.0$ inkubiert, bevor NaCl bzw. Sorbitol in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt wurden. n=3, Fehler = \pm Stabw.

qRT-PCR-Analysen bestätigten eindeutig, dass die Expression von *NQM1* durch Salz- bzw. osmotischen Stress induziert wird (Abbildung 19). Dabei zeigte sich, dass die Induktion der *NQM1* - Expression bei hoher NaCl-Konzentration sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante $\Delta vhr1$ graduell sehr stark anstieg und nach zwei Stunden ein Maximum fand. Nach Zugabe von Sorbitol wurde die Expression von *NQM1* ebenfalls angeregt. Die Expression erreichte dabei bereits nach 30 Minuten ein Maximum. Im weiteren Verlauf sank die Expression graduell ab. Zusätzlich fiel auf, dass die Stärke der Expression zwischen Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$ variierte. Obwohl sich beide Stämme im zeitlichen Expressionsverlauf sehr ähnelten, zeigte sich bei einer Deletion von *VHR1* eine verminderte *NQM1* - Expression, analog zum Phänotyp der *NQM1* - Expression bei einer *VHR1* - Deletion unter verschiedenen Kohlenstoffquellen bzw. Kalorierestriktion (vgl. Abschnitt 4.2.5 Abbildung 15).

Damit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Expression von *NQM1* bei Kontakt zu osmotisch wirksamen bzw. Salzstress auslösenden Substanzen sehr stark induziert

wird. Das Induktionsmuster war dabei spezifisch für den angelegten Stress (vgl. Abbildung 19; qRT-PCR mit NaCl/Sorbitol) und zudem teilweise abhängig von der Präsenz des Transkriptionsfaktors *VHR1*, dessen Deletion die Expression von *NQM1* zwar nicht vollständig reprimierte, jedoch ihre Stärke massiv reduzierte (Abbildung 19, qRT-PCR mit Sorbitol). Durch die graduelle Antwort unter NaCl-Stress im Gegensatz zur weitaus schnelleren und stärkeren *NQM1* - Expression unter Sorbitol-Stress wurde zudem deutlich, dass die Induktion von *NQM1* bei Salzstress möglicherweise nicht die primäre zelluläre Antwort zur Bekämpfung des Stresses darstellt, sondern dass *NQM1* erst als Folge dessen induziert wird und eventuell andere, noch unbekannte Faktoren in der unmittelbaren zellulären Antwort auf Salzstress eine wichtigere Rolle spielen. Im Falle von Sorbitol-Stress scheint die Rolle von *NQM1* weitaus wichtiger zu sein, da ihre Expression bereits nach 30 Minuten ihren Maximalwert erreichte.

4.2.7 Oxidativer Stress induziert die Expression von *NQM1*

Es ist bekannt, dass zellulär auftretender oxidativer Stress zu den natürlichen Begleiterscheinungen des Alterungsprozesses gehört [125–129]. Da im Allgemeinen die zelluläre Toleranz gegenüber Oxidanzien bzw. Reduktanzien als direkte Konsequenz ihrer metabolischen Aktivität angesehen werden kann, wurden im Zuge der zuvor beschriebenen Stresstoleranztests mit osmotisch wirksamen Substanzen ebenfalls die Stresstoleranzen von $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und partiell auch von $\Delta tal1$ - Mutanten gegenüber verschiedener Oxidanzien bzw. Reduktanzien untersucht. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurden dabei auch die Stresstoleranzen unter alternativen Kohlenstoffquellen (Glucose, Galactose, Ethanol, Glycerol) sowie die Stresstoleranz unter stationären Bedingungen untersucht. Die folgenden Oxidanzien und Reduktanzien wurden getestet: Cumolhydroperoxid (CHP), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BHP), Diamid, Menadion (Mena.), Dithiothreitol (DTT), N-Acetyl-Cystein (NAC), Gluthation (reduziert, GSH). Die Ergebnisse sind im Folgenden für die jeweilige Substanz parallel für die haploiden und diploid heterozygoten Stämme unter dem Einfluss wechselnder Kohlenstoffquellen dargestellt. Dabei gilt zu beachten, dass die Kontrollplatten (ohne Oxidanzien/Reduktanzien) nicht für jede Substanz erneut, sondern nur einmalig getropft wurden. Demnach sind eventuell auftretende Phänotypen, welche unabhängig von den getesteten Substan-

zen bestehen, konsistent bei allen Kontrollen sichtbar. Die auftretenden Phänotypen werden bei der Beschreibung des ersten Oxidanz angesprochen und im weiteren Verlauf wird darauf nicht erneut eingegangen.

4.2 Charakterisierung von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

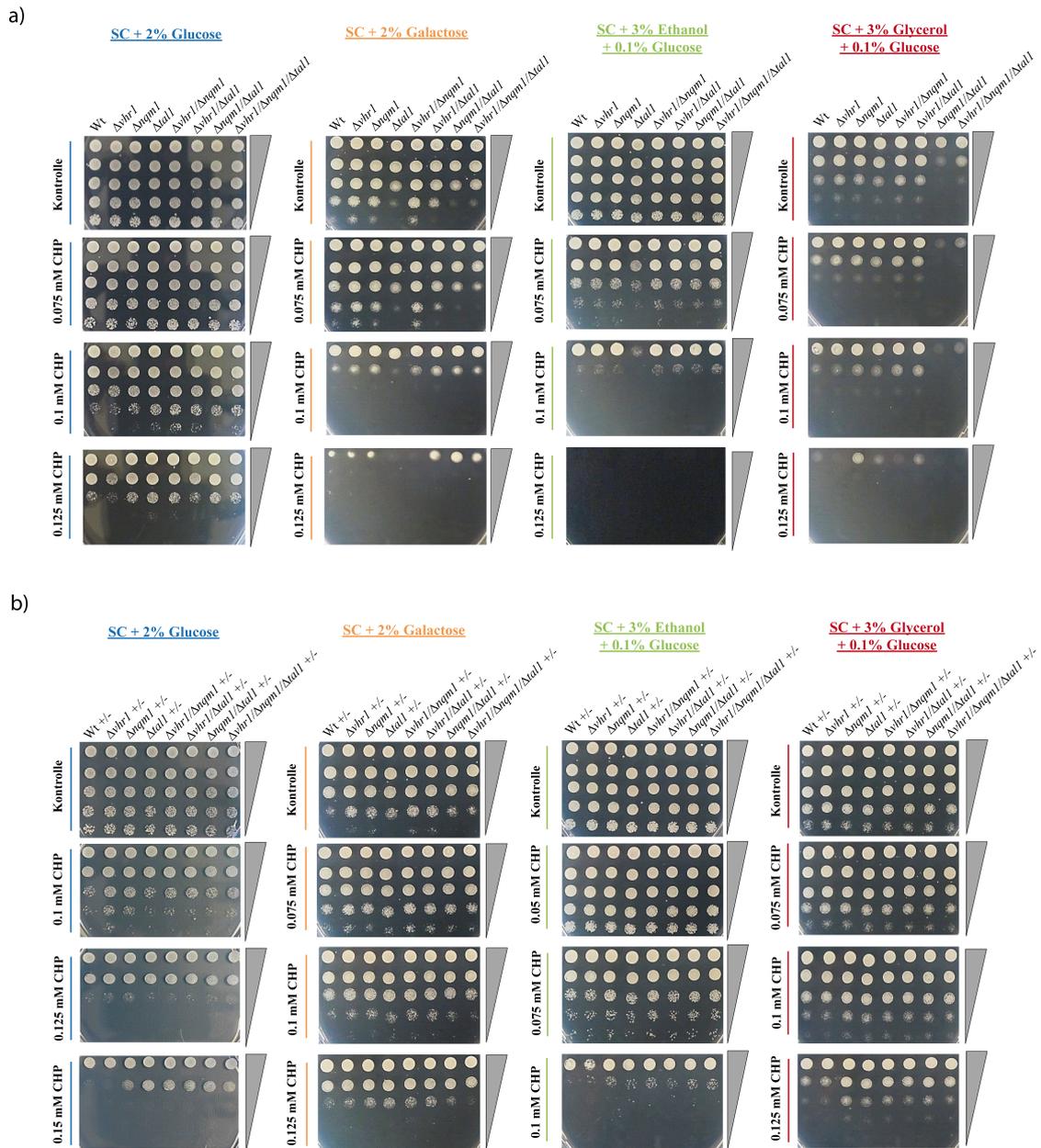


Abbildung 20: CHP-Toleranz von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber CHP für die haploiden (a) und diploid heterozygoten (b) Einzel- bzw. multiplen Deletionsmutanten. a) Auf SC-Glucose zeigten alle Mutanten eine Wildtyp-ähnliche Toleranz gegenüber CHP. Auf SC-Galactose zeigte sich ein Wachstumsdefizit von $\Delta tal1$ - Mutanten, jedoch war die Toleranz gegenüber CHP bei allen Mutanten ähnlich zum Wildtyp. Auf SC-Ethanol reagierte die Mutante $\Delta tal1$ sensitiver gegenüber CHP. Auf SC-Glycerol zeigte sich ein Wachstumsdefizit von Doppeltransaldolasemutanten unabhängig von CHP. b) Bei den diploid heterozygoten Stämmen zeigte sich für den Wildtyp und die Mutante $\Delta vhr1$ eine leichte Sensibilität gegenüber CHP auf SC-Glucose/-Ethanol/-Glycerol. Den Medien wurden die angegebenen Konzentrationen des Oxidanz hinzugefügt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. $n=3$. Cumolhydroperoxid (CHP).

Das aromatische, fettlösliche, synthetische Peroxid CHP erzeugt unter anderem sehr reaktive Radikale (Alkoxy-Radikale), welche zu erhöhter Mutagenität und Zelltoxizität führen können [130, 131]. Die Stresstoleranz der haploiden Mutanten gegenüber CHP war weitestgehend vergleichbar mit dem Wildtyp (Abbildung 20a). Interessanterweise zeigte sich jedoch ein vom Oxidanz unabhängiges Wachstumsdefizit von haploiden $\Delta tal1$ - Mutanten auf SC-Galactose. Dabei war nicht nur die Einzelmutante betroffen, sondern alle Mutanten bei denen *TAL1* deletiert war ($\Delta tal1$, $\Delta vhr1/\Delta tal1$, $\Delta nqm1/\Delta tal1$, $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$). Dies deutet auf die wichtige Funktion von *TAL1* im PPP unter respirativen Bedingungen hin. Weiterhin war das Wachstum auf SC-Glycerol durch eine Doppeldeletion der beiden Transaldolasen *NQM1* und *TAL1* stark beeinträchtigt, was vermuten lässt, dass eine funktionelle Transaldolase, entweder *TAL1* oder *NQM1*, für das Wachstum auf SC-Glycerol essentiell zu sein scheint. Auf SC-Ethanol zeigte sich zudem eine leicht erhöhte Sensibilität der Mutante $\Delta tal1$ bei erhöhten CHP-Konzentrationen. Im diploid heterozygoten Zustand (Abbildung 20b) zeigten sich, bis auf die leichten Sensibilitäten von Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$ gegenüber CHP auf SC-Glucose/-Ethanol/-Glycerol, keine auffälligen Phänotypen. Die Wachstumsdefizite der Mutanten $\Delta tal1$ und $\Delta nqm1/\Delta tal1$ traten nicht auf.

4.2 Charakterisierung von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

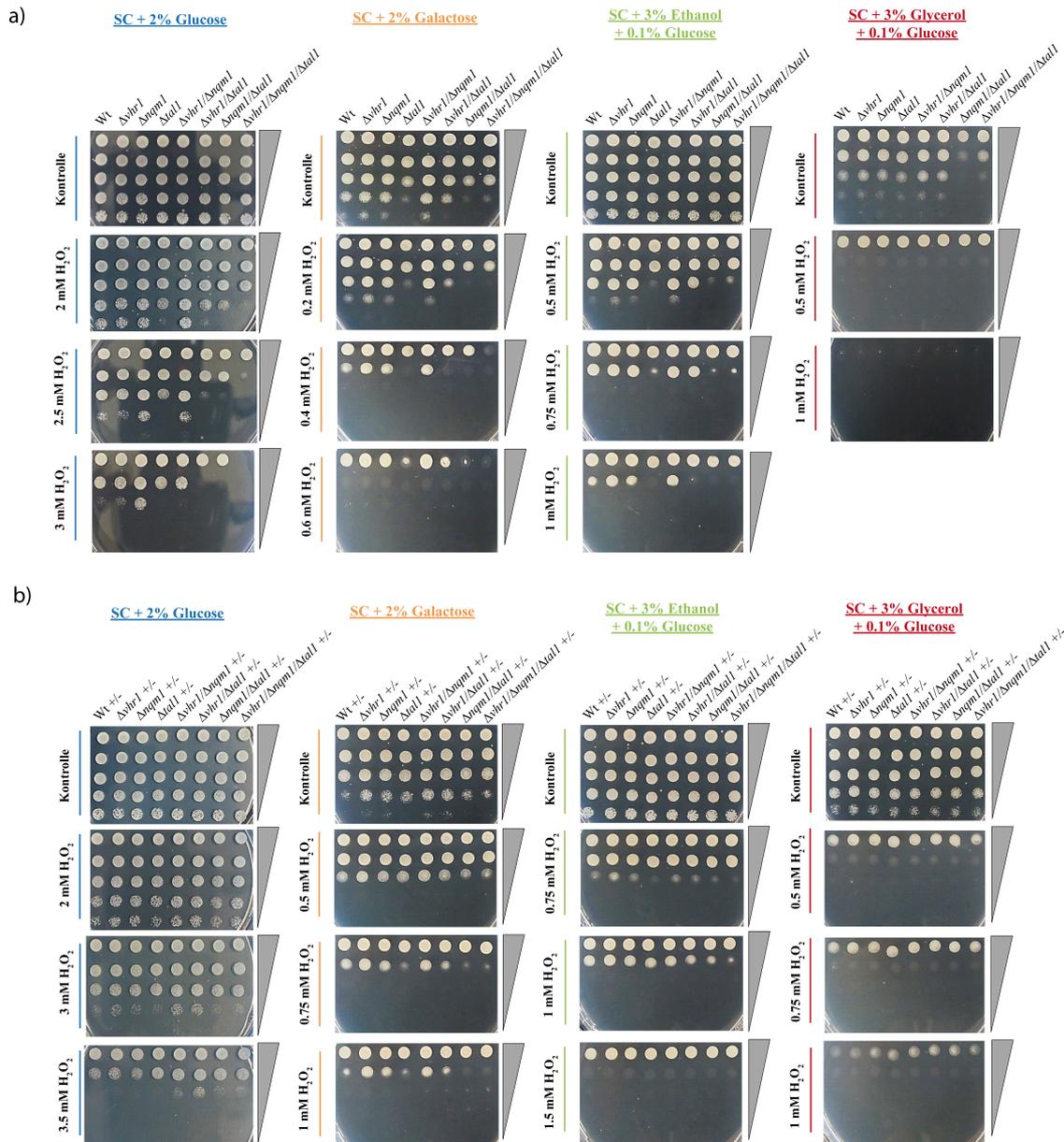


Abbildung 21: H₂O₂-Toleranz von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber H₂O₂ für die haploiden (a) und diploid heterozygoten (b) Einzel- und multiplen Deletionsmutanten. a) Auf SC-Glucose zeigte die Mutante $\Delta nqm1$ eine erhöhte Resistenz, während die Mutanten $\Delta vhr1/\Delta tal1$, $\Delta nqm1/\Delta tal1$ und besonders die Tripelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ eine erhöhte Sensibilität aufwiesen. Auf SC-Galactose war die Toleranz gegenüber H₂O₂ unter Beachtung des generellen Wachstumsdefizits bei allen Mutanten ähnlich zum Wildtyp. Auf SC-Ethanol zeigten alle $\Delta tal1$ - Mutanten eine erhöhte Sensibilität gegenüber H₂O₂. Auf SC-Glycerol glichen die Mutanten dem Wildtyp. Die Doppeltransaldolase mutante sowie die Tripelmutante zeigten jedoch im Vergleich zum Wachstumsdefizit der Kontrolle und zu allen anderen Stämmen eine Resistenz gegenüber H₂O₂. b) Bei den diploid heterozygoten Stämmen zeigte sich für die Mutanten $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ sowie für $\Delta vhr1/\Delta tal1$ eine gesteigerte Resistenz gegenüber H₂O₂ auf SC-Glucose. Bei Galactose zeigte sich für $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und deren Doppeldeletion $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ eine erhöhte Resistenz. Die Mutanten auf SC-Ethanol/-Glycerol zeigten eine zum Wildtyp vergleichbare H₂O₂ - Toleranz. Den Medien wurden die angegebenen Konzentrationen des Oxidanz hinzugefügt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. n=3. Wasserstoffperoxid (H₂O₂).

Die Reaktionen der Mutanten auf H_2O_2 - Stress variierten im Vergleich zum CHP-Stress. Besonders auffällig war, dass die Stämme auf SC-Galactose/-Ethanol/-Glycerol bereits bei relativ geringen H_2O_2 - Konzentrationen deutliche Reaktionen aufwiesen (Abbildung 21). Während die Reaktionen auf CHP phänotypisch weitestgehend unauffällig waren, traten unter H_2O_2 - Stress deutliche Phänotypen in Erscheinung. So zeigte sich auf SC-Glucose bei 3 mM H_2O_2 für die haploide Mutante $\Delta nqm1$ eine erhöhte Resistenz bei gleichzeitig erhöhter Sensibilität der Mutanten $\Delta vhr1/\Delta tal1$, $\Delta nqm1/\Delta tal1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ (Abbildung 21a). Die scheinbare Sensibilität der $\Delta tal1$ - Mutanten auf SC-Galactose kann auf das verringerte Anfangswachstum zurückgeführt werden. Auf SC-Ethanol zeigten alle $\Delta tal1$ - Mutanten bei 0.75 mM H_2O_2 eine erhöhte Sensibilität. Der Phänotyp ähnelte sehr dem Wachstumsdefizit von $\Delta tal1$ - Mutanten auf SC-Galactose. In diesem Fall war er jedoch direkt auf H_2O_2 zurückzuführen, da die SC-Ethanol Kontrollplatte keine Wachstumsdefizite aufwies. Auf SC-Glycerol zeigte sich, dass die Doppeltransaldolasenmutante und die Tripelmutante im Vergleich zu den anderen Stämmen eine erhöhte Resistenz aufwiesen. Es zeichnete sich zwar ein verminderter Wachstumsphänotyp ab, der jedoch im Gegensatz zu den anderen Stämmen bei steigender H_2O_2 - Konzentration weitestgehend konstant blieb. Im diploid heterozygoten Zustand zeigte sich bei den Doppelmutanten $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ und $\Delta vhr1/\Delta tal1$ auf SC-Glucose eine erhöhte Resistenz gegenüber H_2O_2 (Abbildung 21b). Auf SC-Galactose zeigte sich ein analoges Bild zu den haploiden Stämmen auf SC-Galactose und SC-Ethanol, wobei hier erneut (wie schon bei den haploiden Mutanten auf SC-Ethanol) kein initialer Wachstumsdefizit zu verzeichnen war und der Phänotyp damit direkt auf die Wirkung von H_2O_2 zurückzuführen ist. Für die diploid heterozygoten Stämme traten auf SC-Ethanol/-Glycerol keine weiteren Phänotypen auf.

4.2 Charakterisierung von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

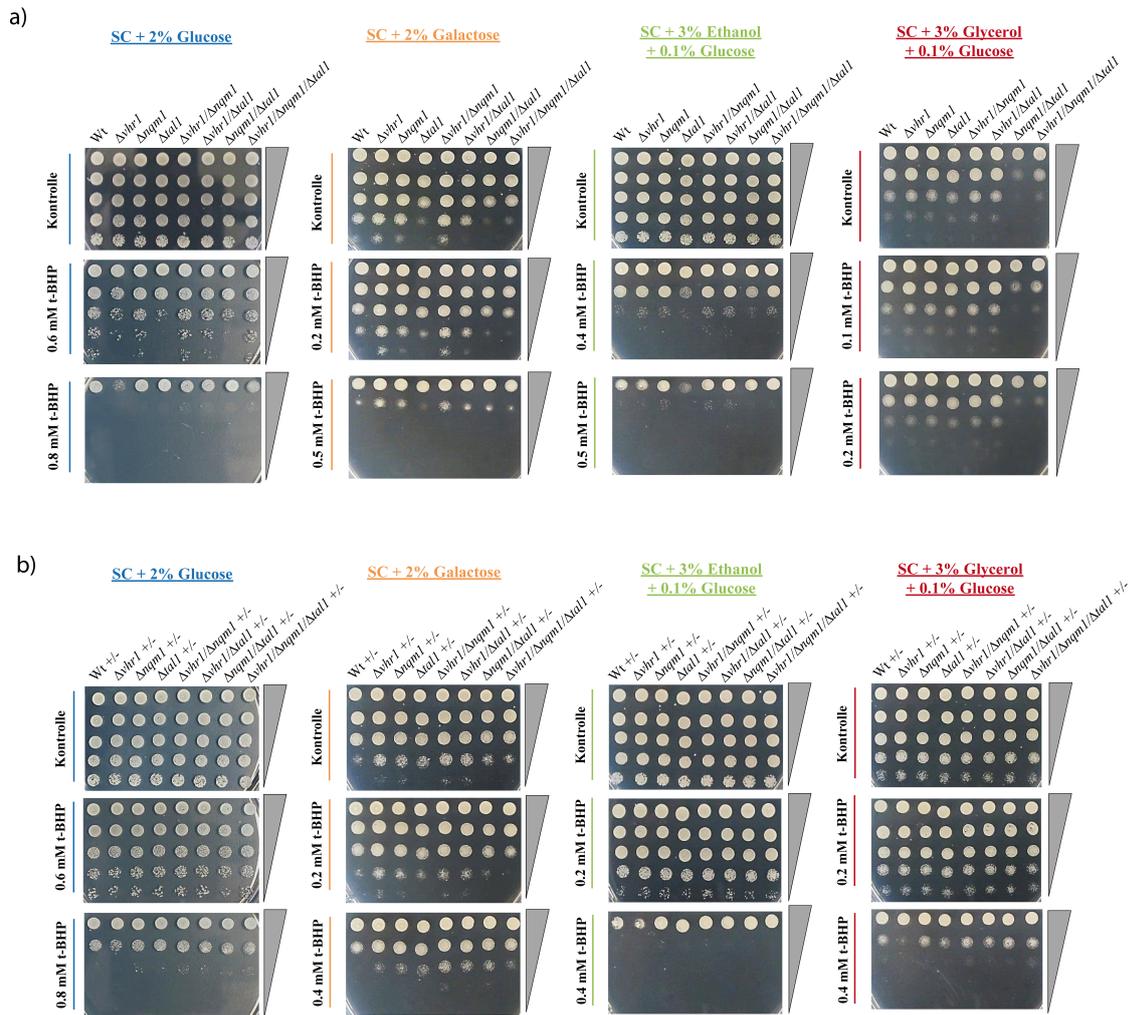


Abbildung 22: *t*-BHP-Toleranz von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber *t*-BHP für die haploiden (a) und diploid heterozygoten (b) Einzel- und multiplen Deletionsmutanten. a) Auf SC-Glucose zeigte sich eine schwache Sensibilität der Mutanten $\Delta vhr1$, $\Delta tal1$ und $\Delta nqm1/\Delta tal1$, wobei nur die Sensibilität der Mutante $\Delta vhr1$ noch bei höheren *t*-BHP-Konzentrationen erkennbar ist. Bei allen weiteren Kohlenstoffquellen waren keine auffälligen Phänotypen zu verzeichnen. b) Für die diploid heterozygoten Mutanten zeigte sich bei allen ein zum Wildtyp vergleichbares Stresstoleranzverhalten. Den Medien wurden die angegebenen Konzentrationen des Oxidanz *t*-BHP hinzugefügt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. n=3, *tert*-Butylhydroperoxid (*t*-BHP).

Im Gegensatz zu dem fettlöslichen CHP ist das synthetische Peroxid *t*-BHP wasserlöslich und dient ebenfalls als Modell für Alkylhydroperoxide [131]. Für das Oxidanz *t*-BHP konnte bis auf eine schwache Sensibilität von haploiden $\Delta vhr1$ - Mutanten auf SC-Glucose keine weiteren Phänotypen beobachtet werden. Generell konnte jedoch erneut gezeigt werden, dass alle Stämme inklusive Wildtyp, im Ver-

gleich zu SC-Glucose, auf alternativen Kohlenstoffquellen bereits bei geringeren *t*-BHP-Konzentrationen sensitiver werden.

Die Stresstoleranztests mit der Thiolgruppen-oxidierenden Substanz Diamid zeigten einen zum Peroxidstress abweichenden Phänotyp. Im haploiden Zustand waren dabei besonders die Mutanten $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ auf SC-Glucose sensitiv und sämtliche durch eine *TAL1* - Deletion beeinträchtigten Stämme resistenter gegenüber Diamid (Abbildung 23a). Auf SC-Ethanol zeigte die Tripelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ eine leichte Resistenz. Ungeachtet der bereits für CHP beschriebenen unabhängigen Wachstumsdefizite bei einigen Stämmen auf SC-Galactose/-Glycerol gab es keine weiteren auffälligen Phänotypen auf den alternativen Kohlenstoffquellen.

Im diploid heterozygoten Zustand zeigte sich auf SC-Glucose bei 1.4 mM Diamid eine starke Sensibilität des Wildtyps und der Mutante $\Delta vhr1$ bei gleichzeitig erhöhter Resistenz der anderen Mutanten gegenüber Diamid (Abbildung 23b). Auf SC-Glycerol war bei 1 mM Diamid eine leicht gesteigerte Resistenz der Mutante $\Delta vhr1$ sowie eine leicht erhöhte Sensibilität der Tripelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ erkennbar.

4.2 Charakterisierung von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

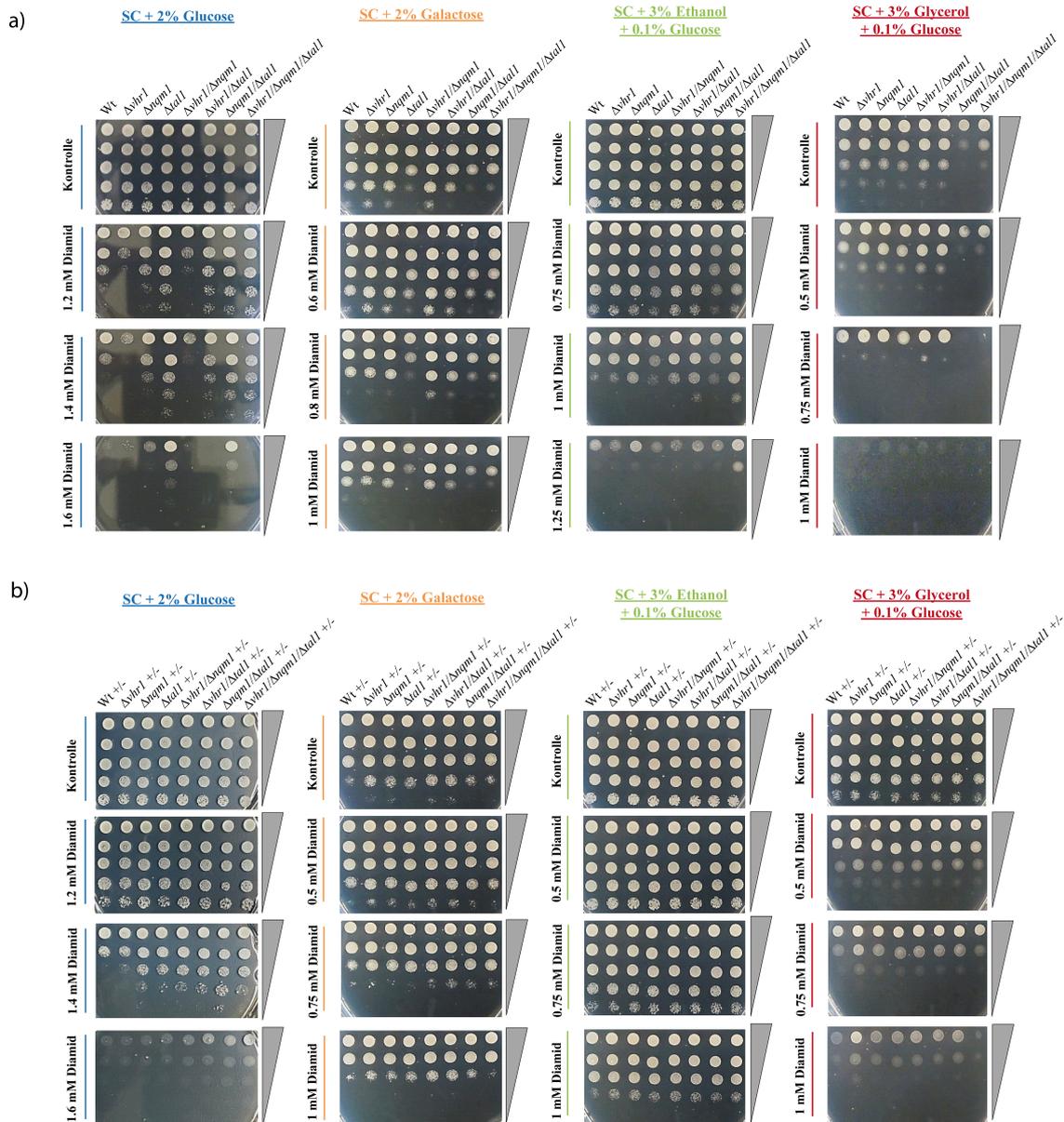


Abbildung 23: Diamid-Toleranz von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber Diamid für die haploiden und diploid heterozygoten (b) Einzel- und multiplen Deletionsmutanten. a) Auf SC-Glucose zeigten alle $\Delta tal1$ - Mutanten eine erhöhte Resistenz gegenüber Diamid. Nur die Mutanten $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ waren sensitiver. Auf SC-Galactose war die Toleranz gegenüber Diamid bei allen Mutanten ähnlich zum Wildtyp. Auf SC-Ethanol reagierte die Tripelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$ mit leicht erhöhter Resistenz. Auf SC-Glycerol glichen die Mutanten ebenfalls dem Wildtyp. b) Für die diploid heterozygoten Stämme zeigte sich für den Wildtyp und die Mutante $\Delta vhr1$ eine starke Sensibilität gegenüber Diamid auf SC-Glucose, während alle weiteren Mutanten erhöhte Resistenzen aufwiesen. Auf SC-Glycerol zeigte sich eine leichte Resistenz der Mutante $\Delta vhr1$ sowie eine leichte Sensibilität der Tripelmutante. Den Medien wurden die angegebenen Konzentrationen des Oxidanz hinzugefügt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. n=3.

4 Ergebnisse

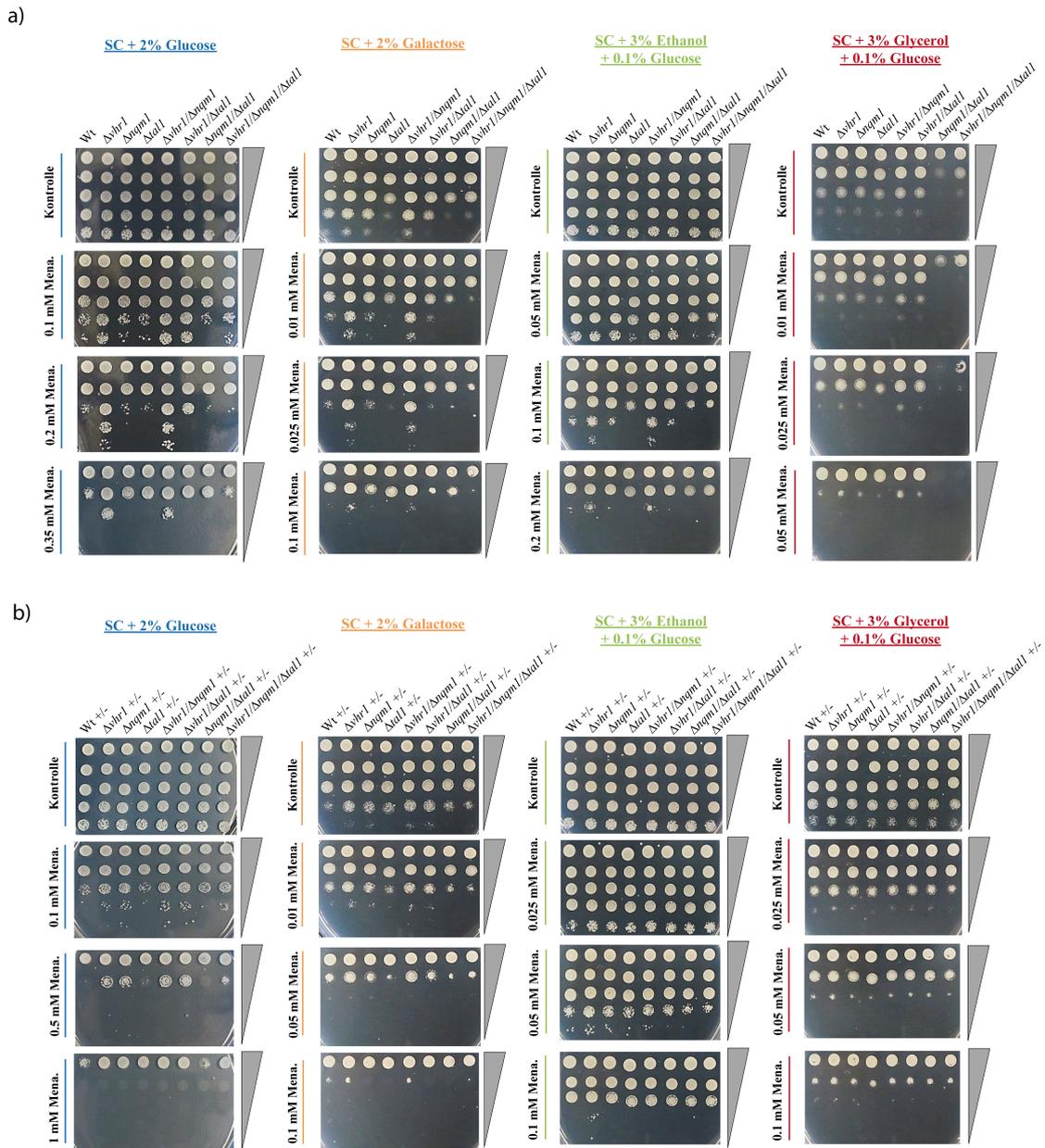


Abbildung 24: Menadion-Toleranz von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber Menadion für die haploiden (a) und diploid heterozygoten (b) Einzel- und multiplen Deletionsmutanten. a) Auf SC-Glucose/-Galactose zeigten die Mutanten $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ eine erhöhte Resistenz, welche sich ebenfalls noch in abgeschwächter Form auf SC-Ethanol erkennen ließ. b) Für die diploid heterozygoten Stämme zeigten sich für alle, außer der Mutante $\Delta nqm1/\Delta tal1$, leicht erhöhte Resistenzen gegenüber Menadion auf SC-Glucose. Den Medien wurden die angegebenen Konzentrationen des Oxidanz hinzugefügt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. n=3.

Im haploiden Zustand ließ sich hauptsächlich für die Mutanten $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ ein gesteigerter Resistenzphänotyp gegenüber dem Superoxid (O_2^-)-

generierenden Oxidanz Menadion (2-Methyl-1,4-Naphtoquinon) erkennen, welcher sowohl auf SC-Glucose als auch auf SC-Galactose und SC-Ethanol auftrat (Abbildung 24a). Im diploiden heterozygoten Genotyp trat nur bei SC-Glucose für alle Stämme außer der Doppeltransaldolasenmutante $\Delta nqm1/\Delta tal1$ eine erhöhte Resistenz gegenüber Menadion in Erscheinung (Abbildung 24b).

Die Stresstoleranztests wurden ebenfalls mit stationären Kulturen durchgeführt. Interessanterweise zeigte sich dabei von allen getesteten Oxidanzien einzig bei Menadion ein sichtbarer Phänotyp, welcher analog zu den in Abbildung 24a gezeigten Resistenzphänotypen auf SC-Glucose und SC-Ethanol war.

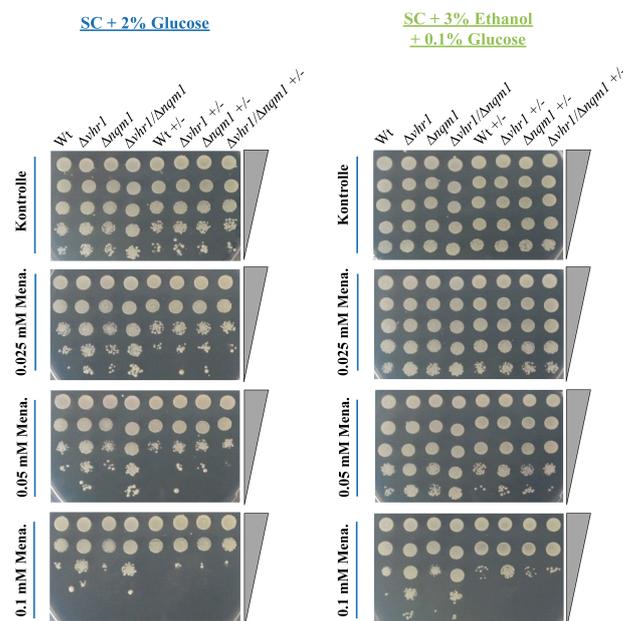


Abbildung 25: Menadion-Toleranz von stationären Kulturen. Stresstoleranz stationärer Kulturen (3 Tage Präinkubation) von haploiden und diploid heterozygoten $\Delta vhr1$ und $\Delta nqm1$ - Mutanten. Die haploiden Mutanten $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ zeigten erhöhte Stresstoleranz gegenüber Menadion auf SC-Glucose und SC-Ethanol. Die diploid heterozygoten Stämme zeigten eine zum Wildtyp vergleichbare Toleranz. n=3. Menadion (Mena.).

Der bereits zuvor beobachtete Resistenzphänotyp der haploiden Mutanten $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ gegenüber erhöhten Menadionkonzentrationen manifestierte sich ebenfalls bei stationären Kulturen (Abbildung 25).

Neben den Effekten von oxidativem Stress wurden zusätzlich die Effekte von erhöhtem reduktiven Stress auf die Stresstoleranz von $\Delta vhr1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta tal1$ - Mutanten untersucht. Zur Induktion von intrazellulärem reduktivem Stress wurden die Substanzen Dithiotreitol (DTT), N-Acetylcystein (NAC) sowie reduziertes Glutathion (GSH red.) in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt.

4 Ergebnisse

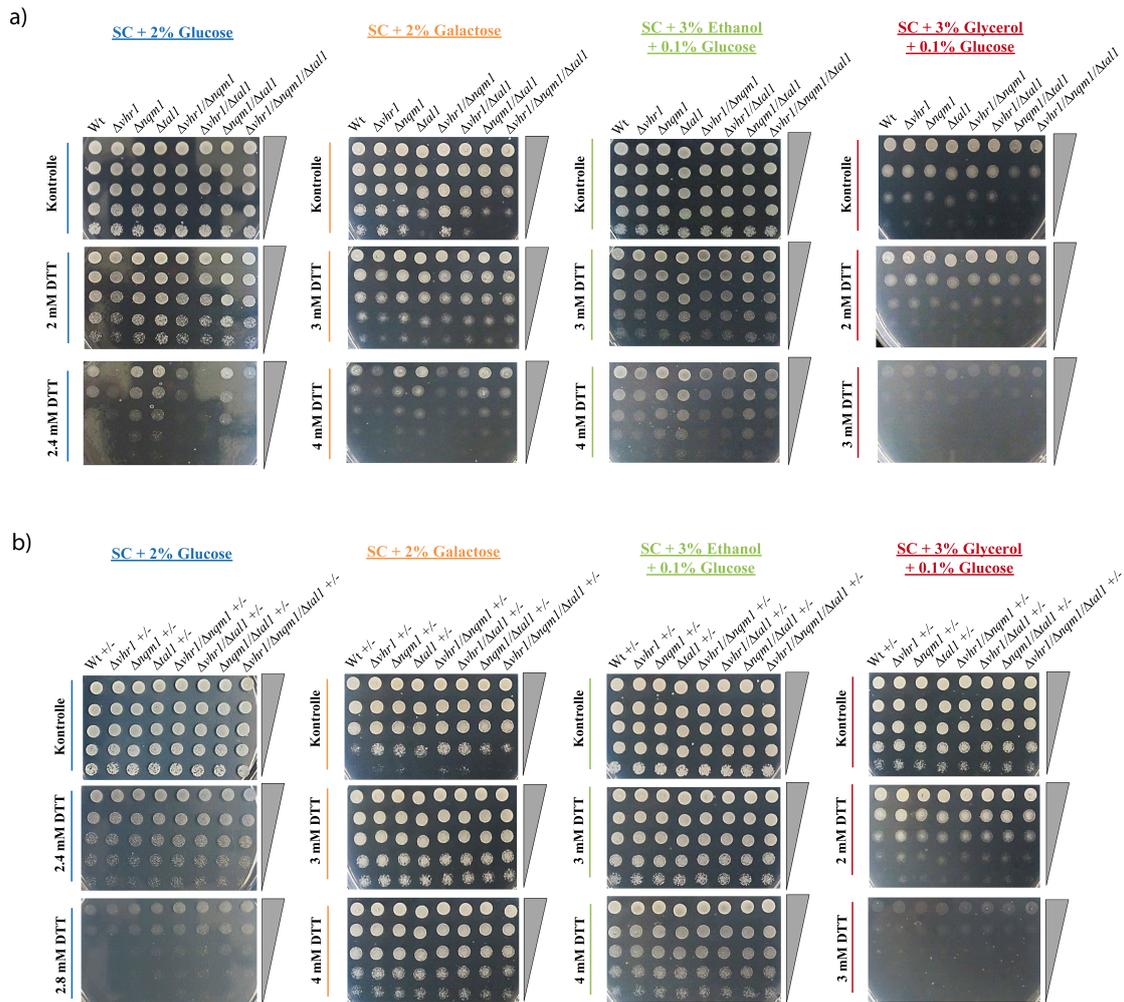


Abbildung 26: DTT-Toleranz von von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber DTT für die haploiden (a) und diploid heterozygoten (b) Einzel- und multiplen Deletionsmutanten. a) Auf SC-Glucose und SC-Galactose zeigten alle Mutanten mit einer $\Delta vhr1$ - Deletion eine erhöhte Sensibilität. b) Für die diploid heterozygoten Stämme ergaben zum Wildtyp vergleichbare Stresstoleranzen. Den Medien wurden die angegeben Konzentrationen des Reduktanz hinzugefügt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. n=3. Dithiothreitol (DTT).

Bei den Stresstests mit der Disulfid-reduzierenden Substanz DTT war besonders auffällig, dass alle haploiden, durch eine *VHR1* - Deletion affizierten Mutanten ($\Delta vhr1$, $\Delta vhr1/\Delta nqm1$, $\Delta vhr1/\Delta tal1$, $\Delta vhr1/\Delta nqm1/\Delta tal1$), eine erhöhte Sensibilität gegenüber höheren DTT-Konzentrationen auf SC-Glucose und SC-Galactose aufwiesen, während es bei den diploid heterozygoten Stämmen zu keinem auffälligen Phänotyp kam (Abbildung 26a/b). Dies deutet daraufhin, dass der Transkriptionsfaktor *VHR1* in der Regulation der zellulären Antwort auf speziell durch DTT-induzierten reduktiven Stress eine wichtige Rolle spielt.

4.2 Charakterisierung von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

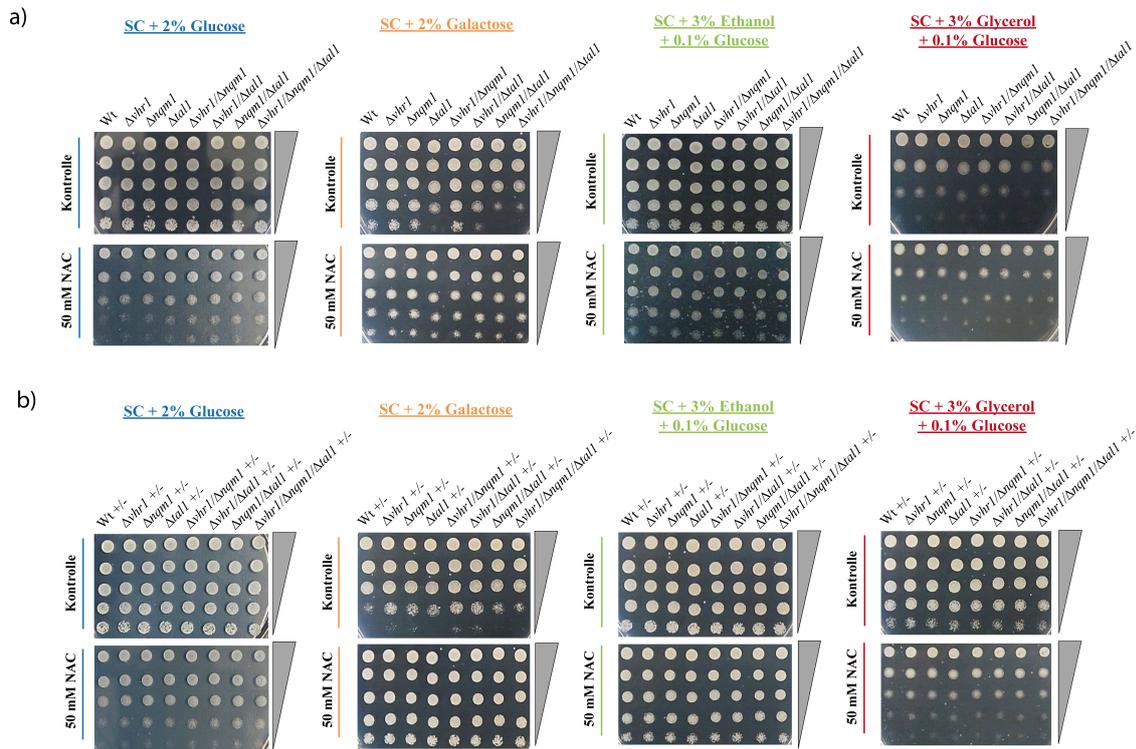


Abbildung 27: NAC-Toleranz von von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber NAC für die haploiden (a) und diploid heterozygoten (b) Einzel- und multiplen Deletionsmutanten. a) Sowohl die haploiden als auch diploid heterozygoten Stämme (b) zeigten keine auffälligen Phänotypen bei Kontakt zu NAC und damit eine zum Wildtyp vergleichbare Stresstoleranz. Den Medien wurden die angegebene Konzentration des Reduktanz hinzugefügt, welche gleichzeitig die höchste, getestete Konzentration darstellt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. n=3. N-Acetylcystein (NAC).

NAC, ein Vorläufer der Glutathionsynthese, zeigte weder bei den haploiden, noch bei den diploid heterozygoten Stämmen auffällige Phänotypen (Abbildung 27). Die Stresstoleranz war bei allen Stämmen und allen getesteten Kohlenstoffquellen analog zum Wildtyp.

4 Ergebnisse

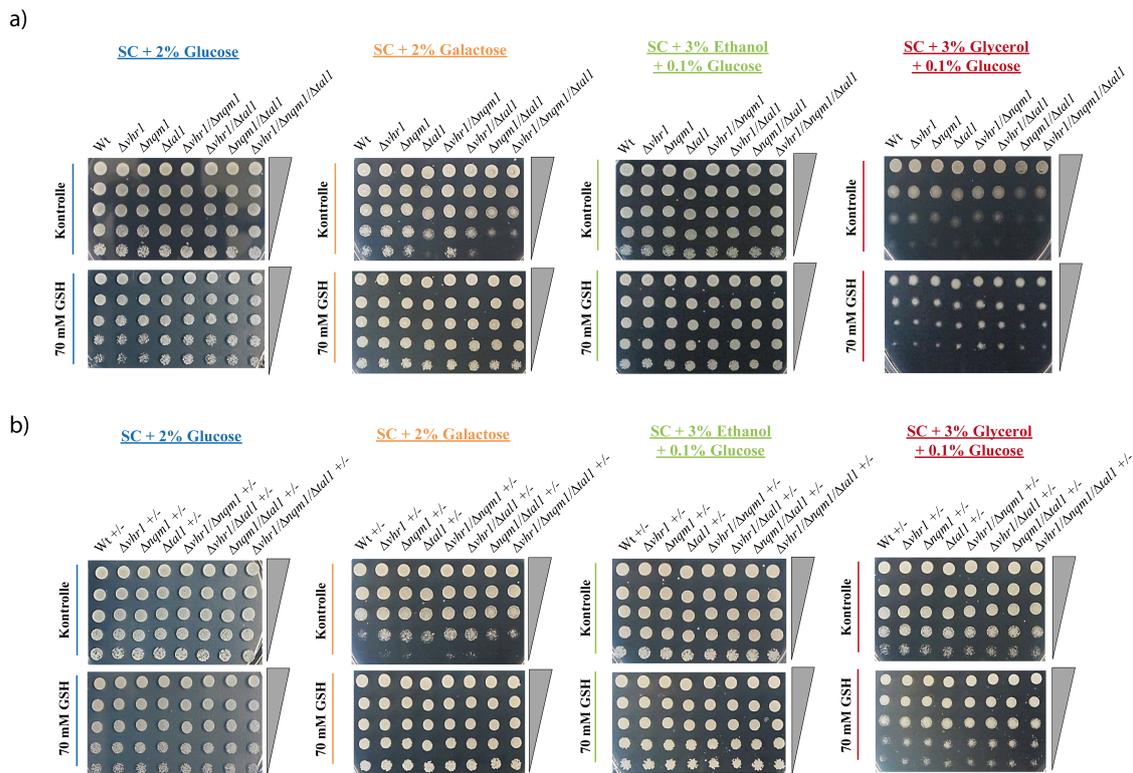


Abbildung 28: GSH-Toleranz von von *VHR1*, *NQM1*, *TAL1* - Mutanten. Stresstoleranz gegenüber reduziertem GSH für die haploiden (a) und diploid heterozygoten (b) Einzel- und multiplen Deletionsmutanten. a) Sowohl für die haploiden als auch diploid heterozygoten Mutanten (b) zeigten sich keine auffälligen Phänotypen bei Kontakt zu GSH (red.) und damit eine zum Wildtyp vergleichbare Stresstoleranz. Den Medien wurden die angegebene Konzentration des Reduktanz hinzugefügt, welche gleichzeitig die höchste, getestete Konzentration darstellt. Eine ÜNK der Stämme wurde in einer Verdünnungsreihe auf die Platten getropft. n=3. Glutathion (GSH red.).

Wie schon bei NAC zeigten sich bei reduziertem GSH weder bei den haploiden noch bei den diploid heterozygoten Stämmen auffällige Phänotypen (Abbildung 28). Die Stresstoleranz war bei allen Stämmen und getesteten Kohlenstoffquellen analog zum Wildtyp.

Um die hier aufgeführten Stresstoleranztests mit sowohl oxidativen als auch reductiven Stress induzierenden Substanzen zusammenzufassen, lässt sich folgendes festhalten: Es konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen *VHR1*, *NQM1* und *TAL1* - Mutanten durch zahlreiche Resistenz- und Sensibilitätsphänotypen im haploiden bzw. diploid heterozygoten Genotyp auszeichneten. Die beobachteten Phänotypen der Deletionsmutanten variierten dabei stark in Abhängigkeit von der getesteten Substanz, ihrer Konzentration und der zugrundeliegenden Kohlenstoff-

quelle. Einerseits belegen sie damit die unterschiedliche Wirksamkeit der Oxidanzien und Reduktanzien auf zellulärer Ebene und andererseits, dass die Interaktion der Gene *VHR1*, *NQM1* und *TAL1* bei der zellulären Abwehr von oxidativen bzw. reduktiven Stress zur Wahrung der funktionellen Integrität eine wichtige, wenn auch mechanistisch noch nicht vollständig aufgeklärte, Funktion erfüllt.

Um des Weiteren zu überprüfen, ob die Expression der Transaldolase *NQM1* unter oxidativen Stressbedingungen induziert wird und welche Rolle dabei der Transkriptionsfaktor *VHR1* einnimmt, wurde analog zu dem bereits demonstrierten Einfluss von osmotischem Stress, die Expression von *NQM1* im Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$ nach Zugabe der Oxidanzien Menadion und H_2O_2 untersucht. Dabei wurden die Stämme bis zur mid-log Phase ($OD_{600} = 0.8 - 1.0$) kultiviert, bevor die Oxidanzien in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt wurden. Nach Zugabe der Oxidanzien wurden drei weitere Zeitpunkte (0.5 h, 1 h, 1.5 h nach der Oxidanzienzugabe) zur Probenentnahme ausgewählt und die *NQM1* - Expression mittels qRT-PCR, wie in Abschnitt 3.21 beschrieben, bestimmt.

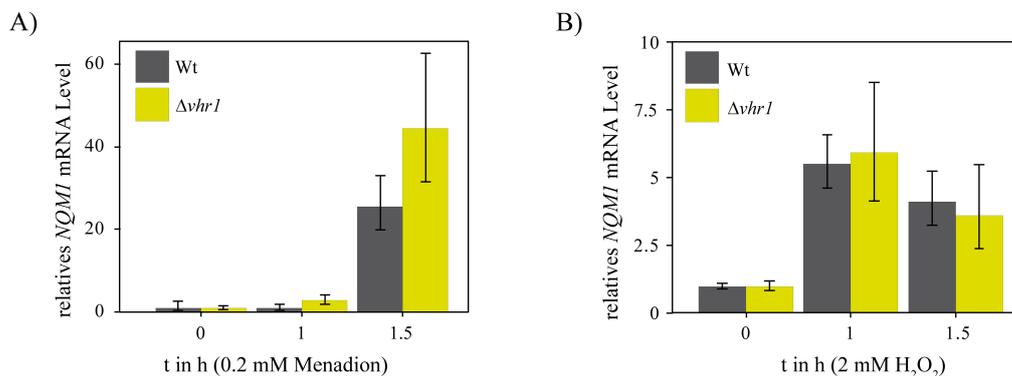


Abbildung 29: Induktion der *NQM1* - Expression bei oxidativen Stress. *NQM1* - Expression unter dem Einfluss von oxidativen Stress (induziert durch Menadion und H_2O_2) im Vergleich zwischen Wildtyp (BY4741) und der Mutante $\Delta vhr1$ über einen Zeitraum von 1.5 h. A) Unter dem Einfluss von 0.2 mM Menadion zeigte sich eine graduell ansteigende *NQM1* - Expression im Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$, wobei die Expression in der Mutante nach 1.5 h deutlich stärker als im Wildtyp war. B) Bei 2 mM H_2O_2 zeigte sich ebenfalls eine Induktion der *NQM1* - Expression in Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$, wobei die beiden Stämme zeitlich und in ihrer Expressionsintensität weitestgehend homolog waren. Generell ist die Induktion von *NQM1* bei H_2O_2 weniger stark als bei Menadion. Die Kulturen wurden in SC bis zur mid-log Phase inkubiert, bevor Menadion bzw. H_2O_2 hinzugefügt wurde. n=3. Fehler = \pm Stabw.

Die qRT-PCR-Analysen bestätigten, dass die Expression von *NQM1* unter oxidativen Stressbedingungen induziert wird (Abbildung 29). Dabei zeigte sich einerseits, dass die Induktion von *NQM1* sowohl bei Stress durch Menadion als auch durch H_2O_2 ausgelöst wird und andererseits, dass die Induktion dabei unabhängig von der Präsenz

des Transkriptionsfaktors *VHR1* erfolgt. Besonders im Fall von Menadion zeigte sich, dass *NQM1* bei vorliegender Deletion von *VHR1* nach 1.5 h stärker exprimiert wurde als im Wildtyp (Wt \sim 25-fach, Mutante \sim 45-fach, vgl. Abbildung 29a), während die Expression von *NQM1* bei H_2O_2 - Stress beim Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$ gleichstark war (Abbildung 29b). Das generelle Expressionsmuster unter Menadion-Stress ähnelt dem Muster unter NaCl-Stress (vgl. Abschnitt 4.2.6, Abbildung 19a), während das Expressionsmuster unter H_2O_2 - Stress, welches durch eine starke initiale und im weiteren Verlauf absinkende Expression gekennzeichnet war, wiederum stark an das Muster unter Sorbitol-Stress erinnert (vgl. Abschnitt 4.2.6, Abbildung 19b). Auch wenn die Expressionsmuster unter oxidativen Stress denen des osmotischen Stresses optisch ähnlich sind, ist die Induktion bei oxidativen Stress im Vergleich zum osmotischen Stress bedeutend niedriger. Dennoch lässt sich, wie schon bei osmotischen Stress, vermuten, dass die Funktion von *NQM1* in der Stressabwehr sehr abhängig von der Stressquelle bzw. Substanz ist. Hier ist sie anscheinend wichtiger bei der unmittelbaren Abwehr von H_2O_2 - induziertem Zellstress, was durch die im Vergleich zum Menadion-Stress schnellere Induktion der *NQM1* - Expression abzuleiten ist. Bei Menadion-Stress lässt sich aufgrund der langsam ansteigenden *NQM1* - Expression vermuten, dass die Funktion von *NQM1* nicht für die initiale Abwehr des oxidativen Stresses benötigt wird, sondern womöglich erst zeitlich versetzt zur Wiederherstellung der zellulären Funktionen erforderlich ist.

4.2.8 Zusammenfassung der Phänotypen von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

Im zurückliegenden Kapitel wurde demonstriert, dass eine Doppeldeletion der Gene *VHR1* und *NQM1* zu einer Haploprofizienz sowohl innerhalb eines komplexen Wettbewerbs von chronologisch gealterten Doppelmutanten als auch in nicht-kompetitiver Umgebung führt. Die Haploprofizienz manifestierte sich sowohl im haploiden als auch im diploid heterozygoten Genotyp unter stationären Bedingungen phänotypisch als gesteigerte Klonogenizität. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Transaldolase *NQM1*, ein Paralog der im PPP lokalisierten *TAL1*, in ihrer Expression durch Glucose reprimiert wird und dass sie funktionell ein stressinduziertes Paralog zu *TAL1* darstellt. Dabei wird sie in ihrer Funktion von *TAL1* unabhängig reguliert und scheint generell eine andere biochemische Funktion zu erfüllen als ihr Paralog

TAL1. Diese Vermutung ist in dem Umstand begründet, dass eine Induktion der *NQM1* - Expression unter zahlreichen Bedingungen (alternative Kohlenstoffquellen, Kalorierestriktion, Salz- bzw. osmotischer Stress, oxidativer Stress) nachgewiesen wurde und dass die Expressionslevel dabei unabhängig von *TAL1* waren. Vielmehr konnte deutlich nachgewiesen werden, dass die vollständige Induktion der *NQM1* - Expression unter einigen Bedingungen (alternative Kohlenstoffquellen, Kalorierestriktion) speziell vom Transkriptionsfaktor *VHR1* abhängig ist, da eine Deletion von *VHR1* in reduzierten *NQM1* - Expressionsleveln resultierte. In anderen Fällen (osmotischer Stress, oxidativer Stress) scheint *VHR1* weniger Einfluss auf die Induktion der *NQM1* - Expression zu haben. Dies demonstriert, dass die Regulation der Transaldolase *NQM1* zum einen von weiteren Faktoren und zum anderen sehr stark von der Art der auftretenden Stresses abhängig ist. Obwohl bisher relativ wenig über die Funktion der Gene *VHR1* und *NQM1* bekannt war, lässt sich zusätzlich zu den bereits beschriebenen induktiven *NQM1* - Expressionsbedingungen bzw. den zahlreichen Stresstoleranzphänotypen sowie anhand der stark veränderten Zuckerphosphat- und Alditolprofile vermuten, dass *NQM1* und *VHR1* eine wichtige Rolle im zentralen Kohlenstoffstoffwechsel einnehmen und zusätzlich an verschiedenen Anpassungen bzw. Facetten des Alterns beteiligt sind.

4.3 Effekte von Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels auf den intrazellulären Aminosäurepool

Aminosäuren zeichnen sich durch zahlreiche regulative Funktionen innerhalb des Zell- und Energiestoffwechsels aus. Eine relativ ungeklärte Frage in diesem Zusammenhang ist, welche Effekte genetische Störungen, die nicht direkt mit den grundlegenden Aminosäurebiosynthesewegen interferieren, im Zusammenspiel mit veränderten Umweltbedingungen auf die Verteilung des intrazellulären Aminosäurepools haben. Dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht, welche Effekte Deletionen von ausgewählten primär glykolytischen bzw. PPP-assoziierten Stoffwechsellzymen in Kombination mit wechselnden Umweltbedingungen (verschiedene Kohlenstoffquellen) auf die Verteilung der intrazellulären Aminosäuren haben.

Dazu wurden der Wildtyp und alle ausgewählten Stoffwechselmutanten bis zur mid-log Phase unter dem Einfluss von fermentierbaren (Glucose), respirativen (Galactose) und gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen (Ethanol) kultiviert und dabei sowohl das Wachstumsverhalten aufgezeichnet als auch die relative Verteilung der intrazellulären Aminosäurekonzentration bestimmt. Die Ergebnisse sollten aufzeigen, inwiefern sich die genetischen Störungen in einer charakteristischen Aminosäureverteilung manifestieren und welche lokale bzw. globale Wirkung die Deletionen der Stoffwechselenzyme dabei auf den Gesamtaminosäurespiegel haben.

4.3.1 Wachstumsverhalten von Stoffwechselmutanten

Zur Untersuchung der Effekte von Deletionen des primären Kohlenhydratstoffwechsels (Glycolyse/PPP) wurden die in Abschnitt 2.4 Tabelle 9 aufgelisteten Deletionsstämme verwendet. Dazu wurden die 20 Mutanten aus unserer Kopie der MAT a - Deletionsbank ausgewählt, deren Enzyme entweder direkt in der Glycolyse lokalisiert sind bzw. durch ihre Funktion nahe an den glykolytischen Reaktionen liegen. Die Glycolysemutanten $\Delta pgi1$, $\Delta tpi1$, $\Delta pgk1$ waren nicht lebensfähig und wurden deshalb nicht berücksichtigt. Unter den 20 untersuchten Glycolysemutanten sind 10 Isoformen glykolytischer Gene vertreten: ($\Delta pgm2$, $\Delta pgm3$, $\Delta hck2$, $\Delta pfk26$, $\Delta pfk27$, $\Delta tdh2$, $\Delta tdh3$, $\Delta gpm3$, $\Delta pyk2$, $\Delta pyc1$). Zur Analyse des PPP wurden 18 Deletionsmutanten ausgewählt (vgl. Abschnitt 2.4 Tabelle 9). Der Deletionsstamm $\Delta rki1$ war nicht lebensfähig und wurde aus diesem Grund nicht berücksichtigt. Unter den 18 PPP-Mutanten waren neun Isozyme vertreten: $\Delta sol2$, $\Delta sol3$, $\Delta sol4$, $\Delta gnd2$, $\Delta tkl2$, $\Delta nqm1$, $\Delta prs3$, $\Delta prs4$, $\Delta prs5$.

Die Wachstumskurven wurden, wie in Abschnitt 3.22 beschrieben, aufgezeichnet. Um Nebeneffekte der Auxotrophie auszuschließen, wurden alle nachfolgend gezeigten Experimente mit prototrophen Deletionsmutanten durchgeführt. Die Mutanten wurden durch Aufnahme des Plasmids pHLUM (vgl. Abschnitt 2.9 Tabelle 15) zur Prototrophie gebracht und anschließend in SM kultiviert.

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

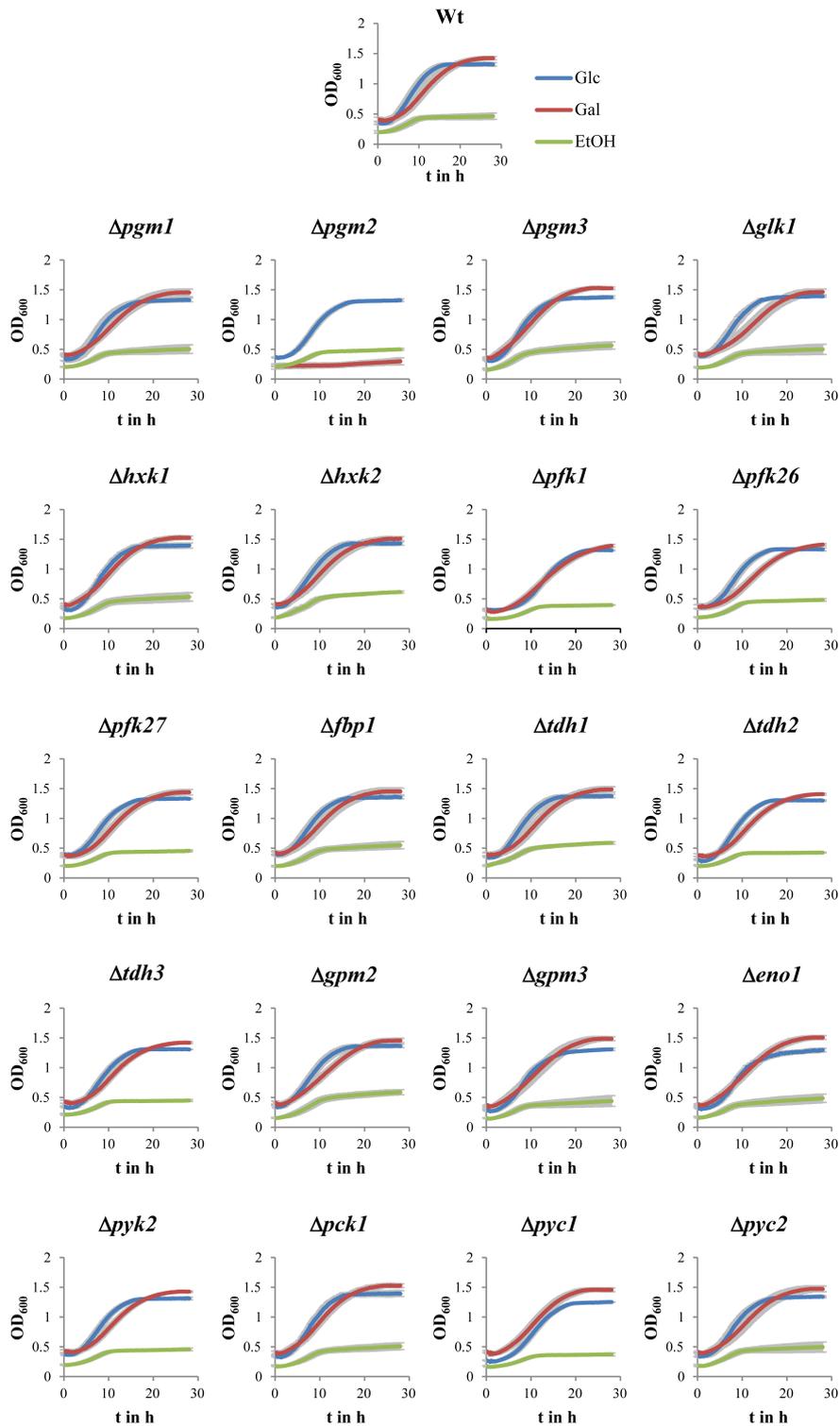


Abbildung 30: Wachstumsverhalten von Glycolysemutanten. (Fortsetzung auf nächster Seite)

4 Ergebnisse

(Fortsetzung von vorheriger Seite) Wachstumsverhalten von Glycolysemutanten unter dem Einfluss von verschiedenen Umweltbedingungen, simuliert durch die Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose, Ethanol. Das Wachstum auf SM-Glucose und SM-Galactose ist weitestgehend analog mit deutlich erkennbaren Abschnitt der lag- (Anlauf), log- (exponentiellen) und stationären Phase. Unter SM-Ethanol ist die stationäre Phase am schnellsten erreicht. Die $\Delta pgm2$ - Mutante zeigte ein deutliches Wachstumsdefizit unter SM-Galactose. Alle Mutanten wurden über Nacht in SM, unter Zugabe der entsprechenden Kohlenstoffquelle vorkultiviert und zu Beginn des Experiments in frischem Medium aufgenommen. Das Wachstum wurde in einen Plattenlesegerät über 50 h aufgezeichnet. Der Median sowie die mittlere Standardabweichung sind dargestellt. n=4.

Das Wachstumsverhalten des Wildtyps und der Mutanten war gekennzeichnet durch eine Anlaufphase (lag-Phase), welche im weiteren Verlauf in die exponentielle Wachstumsphase (log-Phase) überging (Abbildung 30). Diese wies unter SM-Ethanol allgemein eine geringe Steigung auf. Am Ende der exponentiellen Phase traten die Mutanten in die stationäre Wachstumsphase ein (stat.-Phase), welche durch keine weitere Zunahme der optischen Dichte gekennzeichnet war und damit die maximale Populationsdichte darstellt. Die relativen Wachstumsraten der Mutanten wurden bestimmt und in Tabelle 22 aufgelistet.

Tabelle 22: Relative Wachstumsraten von Glycolysemutanten

Mutante	SM-Glucose	SM-Galactose	SM-Ethanol
$\Delta pgm1$	0.98	0.95	0.98
$\Delta pgm2$	0.93	0.11 ***	0.92 **
$\Delta pgm3$	1.06 *	1.07 ***	1.18
$\Delta glk1$	0.98	0.93	0.97
$\Delta hax1$	1.07	1.05 ***	1.03
$\Delta hax2$	0.97	1.01	1.15
$\Delta pfk1$	0.82 ***	0.88 ***	0.92 *
$\Delta pfk26$	0.94	0.88 **	1.13 *
$\Delta pfk27$	0.91 ***	0.99	0.92 **
$\Delta fbp1$	0.95	0.98 *	1.04
$\Delta tdh1$	0.99	1.03	1.10
$\Delta tdh2$	0.97	0.99	0.96
$\Delta tdh3$	0.94 **	0.98	0.94 *
$\Delta gpm2$	0.94	0.92	1.07
$\Delta gpm3$	0.99	0.98	1.01
$\Delta eno1$	1.04	0.98	1.05
$\Delta pyk2$	0.88 ***	1.00	0.91 **
$\Delta pck1$	1.07	1.08	1.09
$\Delta pyc1$	0.81 ***	1.05	0.76 ***
$\Delta pyc2$	1.00	0.97	1.03

Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$)

Bei den Mutanten $\Delta pgm1$, $\Delta glk1$, $\Delta h\acute{x}k2$, $\Delta tdh1$, $\Delta tdh2$, $\Delta gpm2$, $\Delta gpm3$, $\Delta eno1$, $\Delta pck1$ und $\Delta pyc2$ ergaben sich zum Wildtyp vergleichbare Wachstumsraten mit durchschnittlich max. 10% Abweichungen (Tabelle 22). Spezifisch nur bei einer Kohlenstoffquelle verringerte bzw. erhöhte Wachstumsraten fanden sich bei den Mutanten $\Delta fbp1$ (Galactose, verringert), $\Delta h\acute{x}k1$ (Galactose, erhöht) und $\Delta h\acute{x}k2$ (Ethanol, erhöht). Die übrigen Mutanten wiesen größtenteils bei ein bis zwei Kohlenstoffquellen (Glucose/Galactose bzw. Glucose/Ethanol bzw. Galactose/Ethanol) signifikant verringerte Wachstumsraten auf. Eine zum Wildtyp abweichende Wachstumsrate unter Glucose und Galactose fand sich nur bei der Mutante $\Delta pgm3$ (beides erhöht). Unter Glucose und Ethanol traten bei den Mutanten $\Delta pfk27$, $\Delta tdh3$, $\Delta pyk2$, $\Delta pyc1$, im Vergleich zum Wildtyp, verringerte Wachstumsraten auf. Unter Galactose und Ethanol zeigten die Mutanten $\Delta pgm2$ (Galactose, stark verringert) und $\Delta pfk26$ (Ethanol, erhöht) signifikant vom Wildtyp abweichende Wachstumsraten. Besonders auffällig war dabei das signifikante Wachstumsdefizit von $\Delta pgm2$ unter SM-Galactose. Die Mutante $\Delta pfk1$ wies als einzige sowohl bei allen drei Kohlenstoffquellen verringerte Wachstumsraten auf.

Die Wachstumskurven bzw. relativen Wachstumsraten von Gendeletion des PPP wurden analog zu der für die glykolytischen Mutanten beschriebenen Methode aufgenommen.

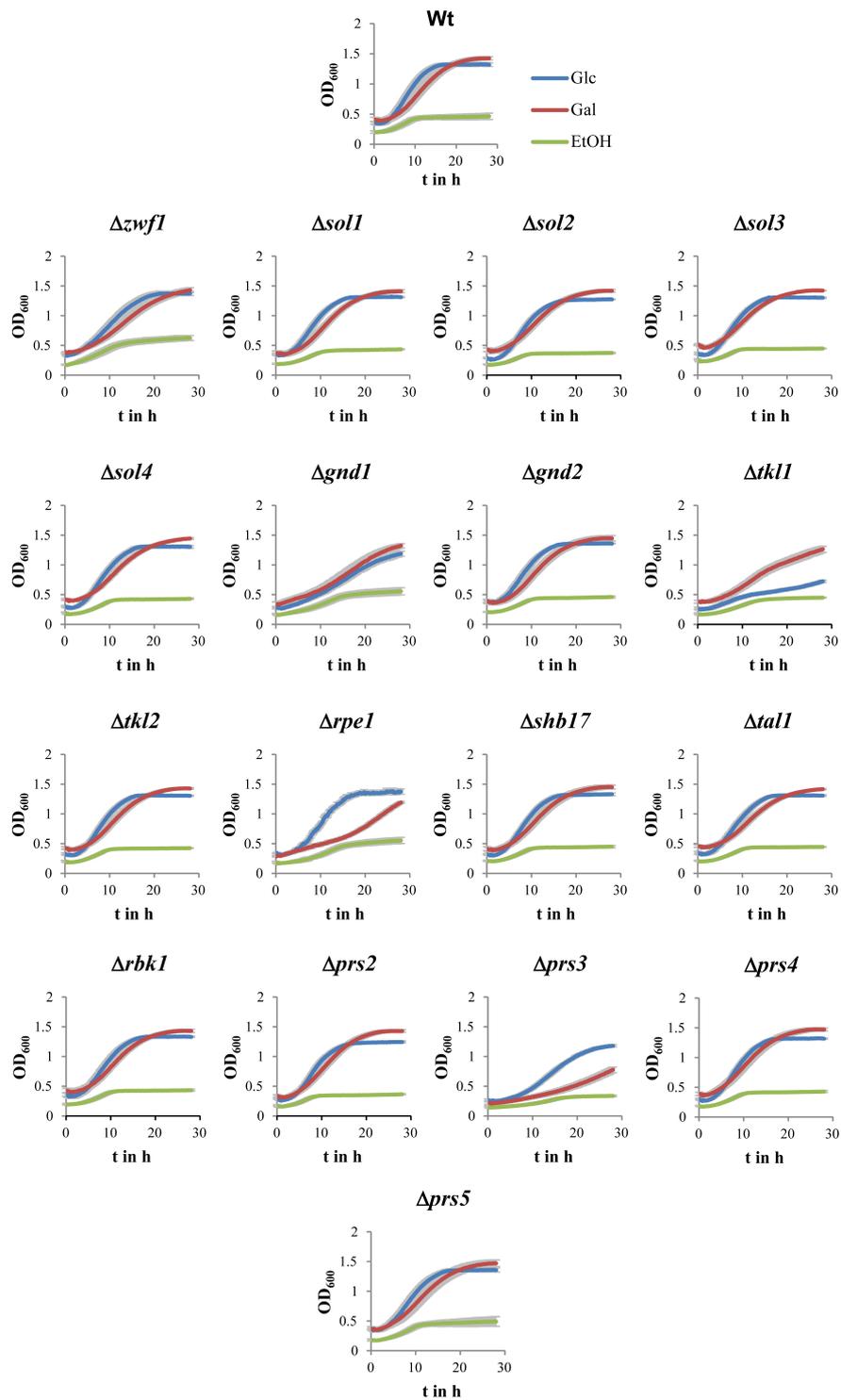


Abbildung 31: Wachstumsverhalten von PPP-Mutanten. (Fortsetzung auf nächster Seite)

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

(Fortsetzung von vorheriger Seite) Wachstumsverhalten von PPP-Mutanten unter wechselnden Umweltbedingungen, simuliert durch die Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose, Ethanol. Der Großteil der Stämme zeigte ein zum Wildtyp vergleichbares Wachstumsverhalten unter allen drei Kohlenstoffquellen. Das Wachstum auf SM-Glucose und SM-Galactose war weitestgehend analog mit deutlich erkennbarem Abschnitt der lag- (Anlauf), log- (exponentiellen) und stationären Phase. Auf SM-Ethanol traten die drei Phasen ebenfalls auf, jedoch war die stationäre Phase deutlich schneller erreicht. Die Mutanten $\Delta gnd1$, $\Delta tkl1$, $\Delta rpe1$ sowie $\Delta prs3$ zeigten teilweise verändertes Wachstum unter SM-Glucose, SM-Galactose oder beiden Kohlenstoffquellen. Alle Stämme wurden über Nacht in SM, unter Zugabe der entsprechenden Kohlenstoffquelle, vorkultiviert und zu Beginn des Experiments in frischem Medium aufgenommen. Das Wachstum wurde in einem Plattenlesegerät über 50 h aufgezeichnet. Der Median sowie die mittlere Standardabweichung sind dargestellt. n=4.

Die relativen Wachstumsraten der PPP-Mutanten wurden bestimmt und in Tabelle 23 aufgelistet.

Tabelle 23: Relative Wachstumsraten von PPP-Mutanten

Mutante	SM-Glucose	SM-Galactose	SM-Ethanol
$\Delta sol1$	0.96	1.02	0.89 *
$\Delta sol2$	0.97	0.95	0.82 ***
$\Delta sol3$	0.99	0.95	1.09 *
$\Delta sol4$	0.97	0.97	1.04
$\Delta gnd1$	0.47 ***	0.69 **	0.90
$\Delta gnd2$	0.96	1.04	0.92 ***
$\Delta tkl1$	0.29 ***	0.66 ***	0.80 **
$\Delta tkl2$	1.00	1.01	1.01
$\Delta shb17$	0.97	0.98	0.92 **
$\Delta tal1$	0.91 ***	0.90 *	0.95
$\Delta rpe1$	0.96	0.75 **	0.85 ***
$\Delta rbk1$	0.97	0.98	0.87 ***
$\Delta prs2$	1.03	1.03	0.93 *
$\Delta prs3$	0.59 ***	0.52 ***	0.55 ***
$\Delta prs4$	1.00	1.04	0.98
$\Delta prs5$	0.92 ***	0.99	1.08
$\Delta zwf1$	0.74 **	0.78 **	0.95

Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$)

Die Wachstumsrate der Mutante $\Delta nqm1$ konnte nicht bestimmt werden, da nur eines der Quadruplikate auswertbar war. Aus Tabelle 23 ergeben sich für die Mutanten $\Delta sol4$, $\Delta tkl2$, $\Delta prs4$ unter allen drei Kohlenstoffquellen zum Wildtyp vergleichbare Wachstumsraten (Abweichungen im Durchschnitt max. 5%). Spezifisch nur bei einer Kohlenstoffquelle verringerte bzw. erhöhte Wachstumsraten fanden sich bei den Mutanten $\Delta sol1$ (Ethanol, verringert), $\Delta sol2$ (Ethanol, verringert), $\Delta sol3$ (Ethanol, erhöht), $\Delta gnd2$ (Ethanol, verringert), $\Delta shb17$ (Ethanol, verringert),

$\Delta rbk1$ (Ethanol, verringert), $\Delta prs2$ (Ethanol, verringert) sowie für $\Delta prs5$ (Glucose, verringert). Die übrigen Mutanten wiesen größtenteils unter ein bis zwei Kohlenstoffquellen (Glucose/Galactose bzw. Glucose/Ethanol bzw. Galactose/Ethanol) signifikant verringerte Wachstumsraten auf. Zum Wildtyp abweichende und verringerte Wachstumsraten unter Glucose und Galactose fanden sich für die Mutanten $\Delta gnd1$, $\Delta tal1$ und $\Delta zwf1$. Unter Galactose und Ethanol zeigte nur die Mutante $\Delta rpe1$ (beide verringert) signifikant vom Wildtyp abweichende Wachstumsraten. Die Mutanten $\Delta tkl1$ und $\Delta prs3$ wiesen als einzige sowohl unter Glucose, Galactose und Ethanol signifikant verringerte Wachstumsraten auf, wobei die Rate bei $\Delta tkl1$ unter Glucose am stärksten signifikant reduziert war.

4.3.2 Aminosäureverteilungsprofil von Stoffwechselmutanten

Zu Beginn des Kapitels wurde bereits erwähnt, dass neben den Wachstumsprofilen auch die Verteilung der intrazellulären Aminosäuren in Glycolyse- und PPP-Mutanten unter verschiedenen Kohlenstoffquellen (Glucose, Galactose, Ethanol) bestimmt wurde. Dies sollte zum einen aufzeigen, inwiefern die Stoffwechselmutanten den zellulären Pool an freien proteinogenen Aminosäuren beeinflussen (lokal bzw. global) und ob die spezifischen Verteilungsprofile bei einer Deletion an der jeweiligen Stelle im Stoffwechselweg einer gewissen Logik folgen bzw. ob die Auswirkung der Deletion ein zu erwartendes oder ein komplett überraschendes Profil hervorruft. Dadurch könnten regulatorische Zusammenhänge einzelner Stoffwechsellzyme auf die Gesamtverteilung der Aminosäuren aufgedeckt werden. Ein weiteres Ziel bestand darin, zu zeigen, welche Aminosäuren am stärksten in ihrer Konzentration durch Deletionen in den beiden Stoffwechselwegen Glycolyse und PPP beeinflusst werden. Zudem ist es durch die parallele Analyse der Aminosäureprofile unter verschiedenen Umweltbedingungen in Kombination mit genetischen Perturbationen möglich, spezifisch gemeinsame bzw. gegenläufige Korrelationscluster einzelner Aminosäuregruppen aufzudecken und gleichzeitig deren Dynamik bzw. Konstanz unter den drei Kohlenstoffquellen zu demonstrieren.

Zur Analyse der Aminosäureprofile wurden die prototrophen Deletionsmutanten in SM-Glucose, SM-Galactose oder SM-Ethanol kultiviert und die Aminosäuren im Anschluss, wie in Abschnitt 3.23 beschrieben, extrahiert. Die Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte nach der in Abschnitt 3.24 beschriebenen Methode. Die so

gewonnenen Konzentrationsdaten wurden mit der Methode von Dieterle *et al.* normalisiert [132]. Im Folgenden werden die Aminosäureverteilungsprofile für die Glycolyse- bzw. PPP-Mutanten für die drei Bedingungen (SM-Glucose, SM-Galactose, SM-Ethanol) der Reihe nach detailliert besprochen und abschließend zusammenfassend verglichen.

4.3.2.1 Aminosäureprofil von Glycolyse- / PPP-Mutanten in SM-Glucose

Im Folgenden sind die Aminosäureverteilungsprofile von Glycolyse- und PPP-Mutanten nach Kultivierung in synthetischem Glucoseminimalmedium (SM-Glucose) aufgezeigt. Die relativen Konzentrationen (Quotient aus Mutante und Wildtyp) wurden dazu zuvor \log_2 -transformiert, um die Abweichungen zum Wildtyp zu verdeutlichen. Die signifikanten Änderungen nach Student's t-Test wurden zusätzlich abgebildet. Die Aminosäure Cystein ist kein Bestandteil der nachfolgenden Analysen, da diese aufgrund von Degradierungsprozessen nicht quantifiziert werden konnte.

Aminosäureverteilungsprofile von Glycolysemutanten in SM-Glucose

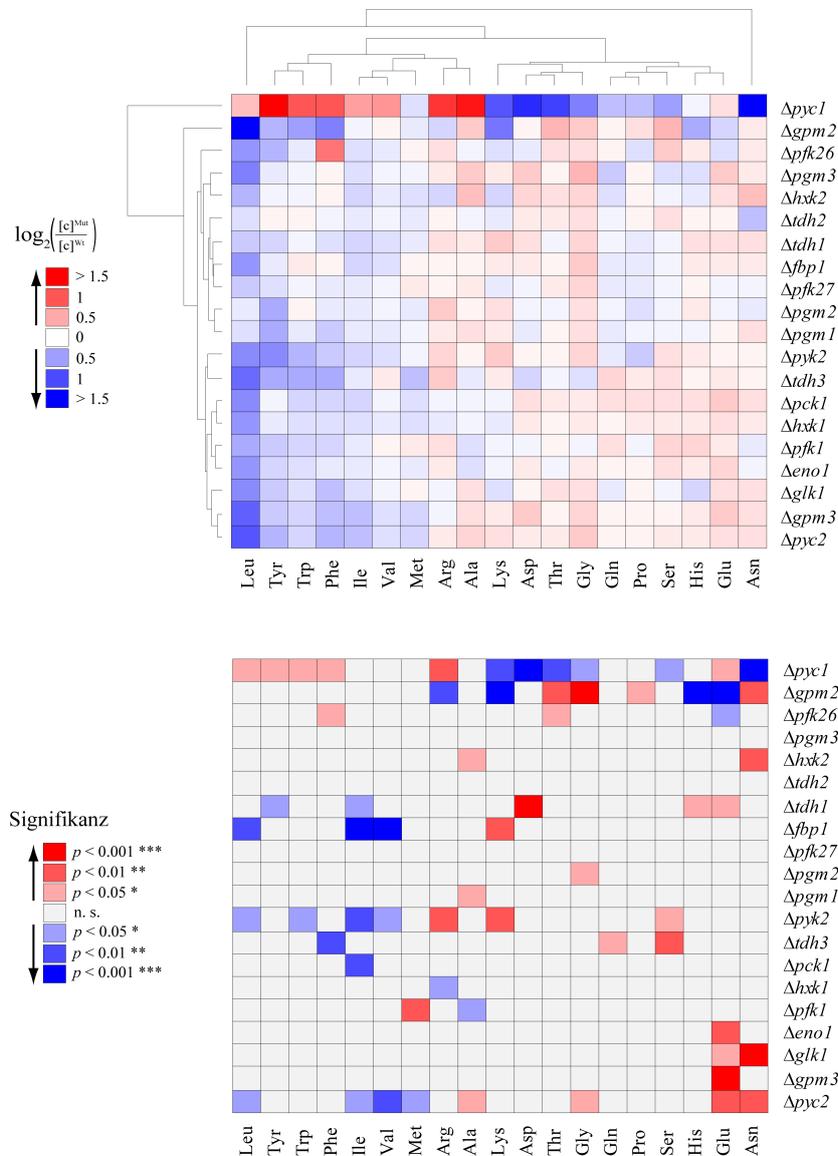


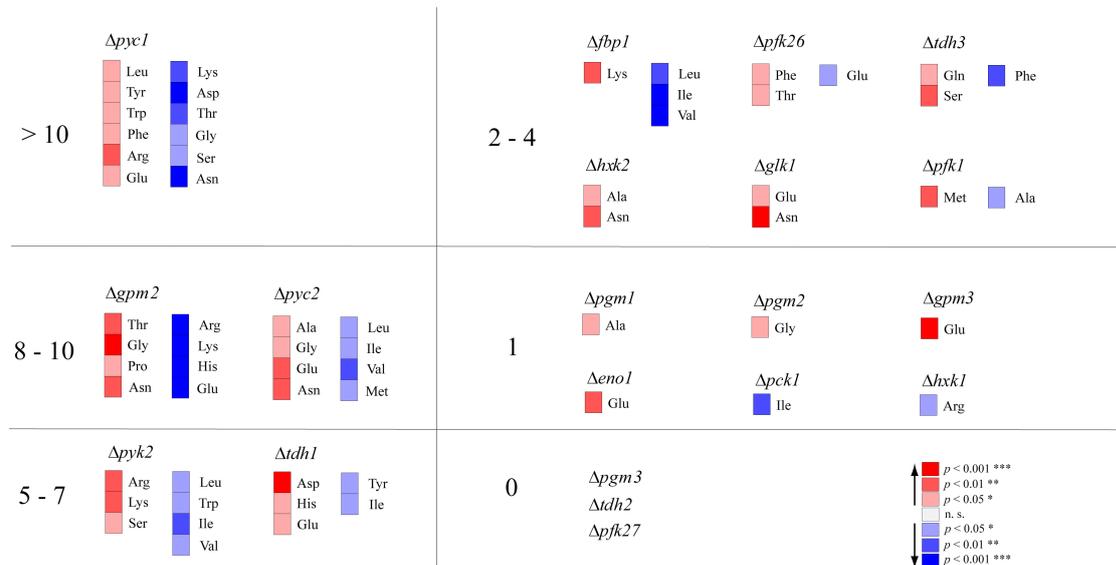
Abbildung 32: Aminosäureverteilungsprofil von Glycolysemutanten in SM-Glucose. Aminosäureverteilungsprofil von 20 Glycolysemutanten. Obere Heatmap: Die relativen Konzentrationen (als \log_2 (Ratio Mutante/Wildtyp)) sind als Heatmap dargestellt, wobei das Wildtyplevel (weiß), erhöhte Konzentrationen (rot), verringerte Konzentrationen (blau) farblich gekennzeichnet sind. Untere Heatmap: Die Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***) verdeutlichen die signifikant vom Wildtyp abweichenden Konzentrationen. $n=4$; Leu (Leucin), Tyr (Tyrosin), Trp (Tryptophan), Phe (Phenylalanin), Ile (Isoleucin), Val (Valin), Met (Methionin), Arg (Arginin), Ala (Alanin), Lys (Lysin), Asp (Aspartat), Thr (Threonin), Gly (Glycin), Gln (Glutamin), Pro (Prolin), Ser (Serin), His (Histidin), Glu (Glutamin), Asn (Asparagin).

Die in Abbildung 32 dargestellten Heatmaps lassen folgende Aussagen zu: Die maximalen Veränderungen in der Konzentration betragen im Allgemeinen nicht

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

mehr als 1-fach (\log_2) der Konzentration des Wildtyps. Nur die Mutante $\Delta pyc1$ wies Konzentrationsveränderungen bis über 1.3-fach (\log_2) auf. Der Großteil der beobachteten veränderten Aminosäurekonzentrationen war nicht signifikant verschieden zur Wildtypkonzentration. Abbildung 33 fasst die Anzahl und Art der signifikanten Änderungen, ausgehend von Abbildung 32, spezifisch für jede Deletionsmutante übersichtlich zusammen.

a) Übersicht der signifikanten Änderungen in der jeweiligen Deletionsmutante



b) prozentuale Verteilung der veränderten Aminosäuren in den Deletionsmutanten

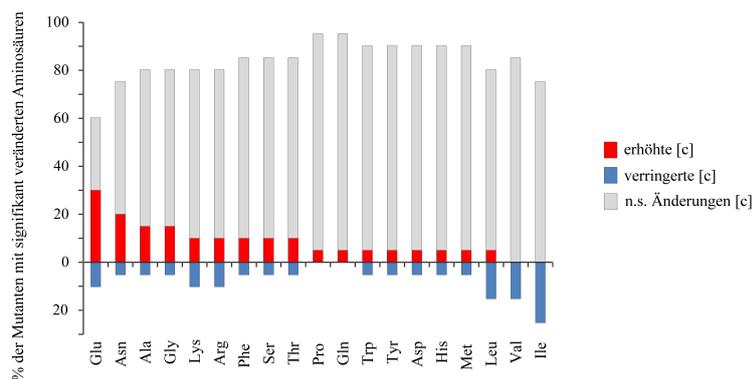


Abbildung 33: Signifikant veränderte Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Glucose. a) Die Mutanten wurden entsprechend der Anzahl ihrer signifikant veränderten Aminosäuren gruppiert und die spezifisch veränderten Aminosäuren wurden, relativ zum Wildtyp, farblich gekennzeichnet. Wildtyp (weiß), Signifikant erhöhte Konzentrationen (rot), Signifikant verringerte Konzentrationen (blau). b) Prozentuale Verteilung der signifikant veränderten Aminosäuren über alle Mutanten. Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

Aus Abbildung 33a wird die hierarchische Abfolge der Deletionsmutanten entsprechend ihrer Anzahl an signifikanten Aminosäurekonzentrationsveränderungen deutlich. So zeigten die Mutanten $\Delta pyc1$ (12), $\Delta gpm2$, $\Delta pyc2$ (jeweils 8) und $\Delta pyk2$ (7) und $\Delta tdh1$ (6) unter dem Einfluss von Glucose die meisten in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren. Es folgen die Mutanten, bei denen weniger als $\frac{1}{4}$ der 19 untersuchten Aminosäurenkonzentrationen verändert waren, d.h. es traten bei maximal 1-4 Aminosäuren signifikant veränderte Konzentrationen auf. Diese Gruppe umfasst die Mutanten $\Delta fbp1$ (4), $\Delta pfk26$ (3), $\Delta tdh3$ (3), $\Delta hxx2$ (2), $\Delta glk1$ (2), $\Delta pfk1$ (2). Für die Gruppe bestehend aus den Mutanten $\Delta pgm1$, $\Delta pgm2$, $\Delta gpm3$, $\Delta eno1$, $\Delta pck1$ und $\Delta hxx1$ trat nur eine veränderte Aminosäurekonzentration auf. Die Mutanten $\Delta pgm3$, $\Delta tdh2$, $\Delta pfk27$ zeigten keine signifikant veränderten Konzentrationen.

Aus Abbildung 33b wird erkennbar, welche Aminosäuren prozentual über alle Mutanten betrachtet am häufigsten von Konzentrationsänderungen betroffen waren. So zeigten 30% der Mutanten erhöhte Konzentrationen von Glutamat (Glu), 20% von Asparagin (Asn) sowie jeweils 17% von Alanin (Ala) und Glycin (Gly). Jeweils 10% der Mutanten zeigten erhöhte Konzentrationen von Lysin (Lys), Arginin (Arg), Phenylalanin (Phe), Serin (Ser) und Threonin (Thr) an und jeweils 5% der Mutanten wiesen erhöhte Konzentrationen von Prolin (Pro), Glutamin (Gln), Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr), Aspartat (Asp), Histidin (His), Methionin (Met) und Leucin (Leu) auf. Die am häufigsten von negativen Änderungen (verringerte Konzentrationen) betroffenen Aminosäuren in den Mutanten waren Isoleucin (Ile) bei 25% der Mutanten sowie Leucin (Leu) und Valin (Val) bei jeweils 15% der Mutanten. Zusätzlich zeigten jeweils 10% der Mutanten verringerte Konzentrationen von Glu, Lys und Arg und weitere 5% der Mutanten jeweils verringerte Konzentrationen an Asn, Ala, Gly, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, Asp, His und Met. Daraus ergibt sich, dass die Mutanten insgesamt am häufigsten von Konzentrationsänderungen für die Aminosäuren Glutamat, Asparagin und Isoleucin betroffen waren.

Im nächsten Schritt kann man die Aminosäuren entsprechend ihres metabolischen Vorläufermetaboliten, d.h. des Metaboliten, der das primäre Kohlenstoffgerüst der späteren Aminosäure bereitstellt, gruppieren, um eventuelle Trends der Vorläufercluster zu erkennen. In Abbildung 34 sind die Aminosäuren entsprechend ihres gemeinsamen metabolischen Vorläufers gruppiert.

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

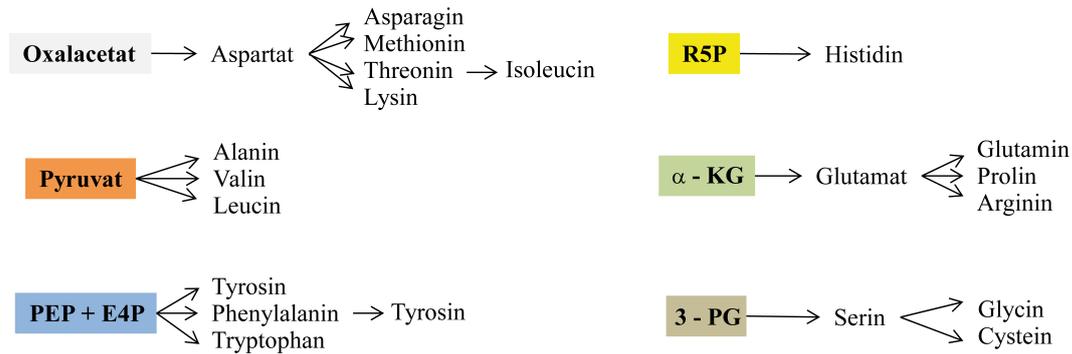


Abbildung 34: Vorläufermetaboliten von Aminosäuren. Die metabolischen Vorläufer der proteinogenen Aminosäuren sind dargestellt. Die Vorläufer sind Metaboliten aus den Stoffwechselwegen Glycolyse (Pyruvat, Phosphoenolpyruvat (PEP), 3-Phosphoglycerat (3-PG)), PPP (Erythrose-4-phosphat (E4P), Ribose-5-phosphat (R5P)) und Citratzyklus (Oxalacetat, α -Ketoglutarat (α -KG)).

Die Mutanten, welche generell die häufigsten Änderungen aufwiesen ($\Delta pyc1$, $\Delta gpm2$, $\Delta pyc2$, $\Delta pyk2$), zeigten dabei die meisten Konzentrationsänderungen in den Aminosäuren der Vorläufercluster ausgehend von Pyruvat, 3-Phosphoglycerat, Oxalacetat sowie α -Ketoglutarat. Im Speziellen ließ sich bei der $\Delta pyc1$ - Mutante erkennen, dass besonders die Aminosäuren der Vorläufercluster Pyruvat (Leu), α -Ketoglutarat (Arg, Pro) und zudem die aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) aus dem Phosphoenolpyruvat + Erythrose-4-phosphat-Cluster leicht erhöhte Konzentrationen zeigten. Reziprok dazu verhielten sich die Aminosäurekonzentrationen, welche aus den Metaboliten Oxalacetat (Lys, Asp, Thr, Asn) und 3-Phosphoglycerat (Ser, Gly) hervorgehen. Die Mutante $\Delta gpm2$ wies für einzelne Vertreter der Vorläufer Oxalacetat (Thr, Asn), α -Ketoglutarat (Pro) und 3-Phosphoglycerat (Gly) erhöhte Konzentrationen auf und zeigte für andere Vertreter aus denselben Vorläuferclustern (Arg, Lys, Glu) sowie für His (aus Ribulose-5-phosphat) verringerte Konzentrationen. Die Mutante $\Delta pyc2$ verhielt sich analog zur $\Delta gpm2$ - Mutante und wies erhöhte Konzentrationen für Vertreter aus den Vorläuferclustern Oxalacetat (Asn), α -Ketoglutarat (Glu), 3-Phosphoglycerat (Gly) und zudem Pyruvat (Ala) auf. Verringerte Konzentrationen betrafen die Aminosäuren Leu und Val aus dem Pyruvat- sowie Ile und Met aus dem Oxalacetatcluster. Für die Mutante $\Delta pyk2$ ergaben sich erhöhte Konzentrationen für die Vertreter aus den Clustern Oxalacetat (Lys), α -Ketoglutarat (Arg) und 3-Phosphoglycerat (Ser) sowie verringerte Konzentrationen aus den Clustern Pyruvat (Leu, Val), Phosphoenolpyruvat + Erythrose-4-phosphat (Trp) und erneut Oxalacetat (Ile).

Funktionelle paarweise Korrelationsanalyse der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Glucose

Als Metaboliten werden organische Moleküle bezeichnet, welche nicht direkt durch das Genom codiert sind und deren Synthese von zahlreichen Enzymen kontrolliert wird. Weiterhin sind Metaboliten, im Gegensatz zu Transkripten und Proteinen, welche in der Regel durch Neusynthese ausgehend von genomischen Informationen hervorgehen, aufgrund der Tatsache, dass sie zusätzlich ineinander umgewandelt werden können, von der Konzentration anderer Metaboliten abhängig. Diese Abhängigkeit findet sich bspw. nicht für Transkripte bzw. Proteine [133]. Zur Demonstration der spezifischen Abhängigkeiten von Stoffwechselmetaboliten werden im Allgemeinen sogenannte Korrelationsanalysen angewendet.

Zur Beantwortung der Frage, ob es für die Aminosäuren ebenfalls gemeinsame Korrelationscluster gibt, wurde über alle Glycolyseutanten ein Korrelationsdiagramm nach Pearson erstellt. Dazu wurden die Verhältnisse des Medianwerts der Mutanten zum Wildtyp für alle analysierten Aminosäuren über alle Glycolysemutanten korreliert.

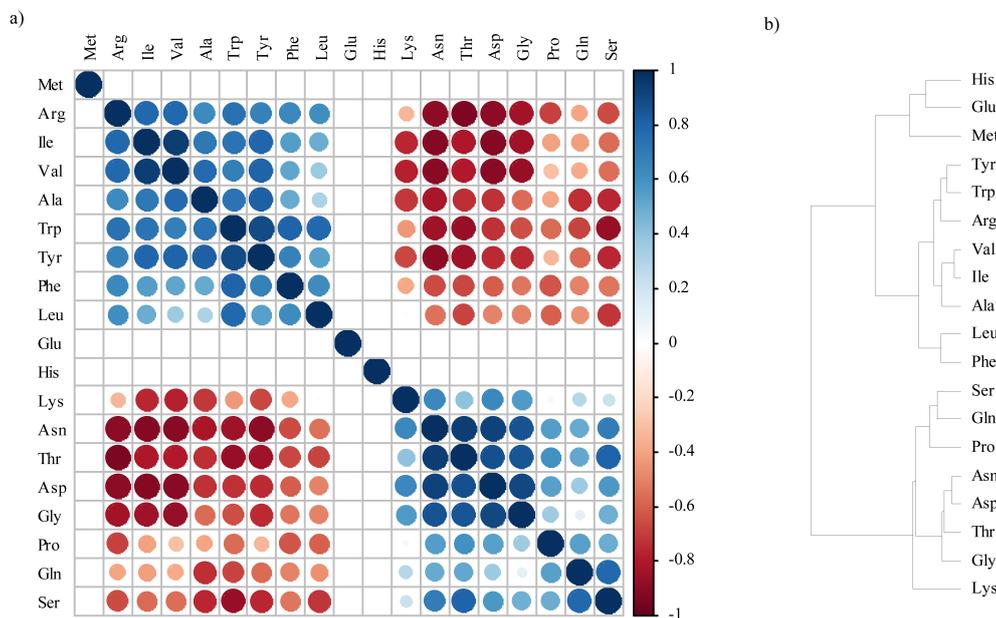


Abbildung 35: Pearsonkorrelationsdiagramm- / dendrogramm der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Glucose. a) Die paarweisen Korrelationswerte (Signifikanzschranke $p < 0.01$) von 19 Aminosäuren über 20 Glycolysemutanten nach Pearson. Negative Korrelation (rot), Positive Korrelation (blau). b) Das resultierende Korrelationsdendrogramm auf Basis der Korrelationswerte nach Pearson.

Aus Abbildung 35a geht hervor, dass es unter allen 19 analysierten Aminosäuren zur Bildung von zwei Hauptkorrelationsclustern kommt. Cluster 1 zeigt eine relativ gleichmäßige, stark positive Korrelation von den Aminosäuren Arg, Ile, Val, Ala, Trp, Tyr, Phe und Leu. Dies zeigt, dass besonders die aromatischen (aus den Vorläufermetaboliten PEP+E4P) und die pyruvatogenen Aminosäuren positiv korreliert sind. Cluster 2 zeigt ebenfalls eine stark positive Korrelation zwischen den Aminosäuren Lys, Asn, Thr, Asp, Gly, Pro, Gln und Ser, wobei die Korrelationen von Asn, Thr, Asp und Gly innerhalb der Gruppe am stärksten ist. In diesem Fall sind bevorzugt die aus den Metaboliten Oxalacetat, α -Ketoglutarat und 3-Phosphoglycerat hervorgehenden Aminosäuren korreliert. Positive Korrelation bedeutet, dass sich die Konzentrationen der Aminosäuren in Abhängigkeit voneinander gleichermaßen erhöhen bzw. verringern. Die beiden Cluster sind gegeneinander antikorreliert, wobei die deutlichste Antikorrelation einerseits zwischen der Aminosäuregruppe Asn, Thr, Asp und Gly und andererseits zwischen der Gruppe Arg, Ile, Val, Ala, Trp und Tyr besteht. Im Gegensatz zu positiver Korrelation bedeutet die vorliegende negative Korrelation, dass sich diese Aminosäuren gegensätzlich in ihrer Konzentration verändern, d.h. wenn die Konzentrationen der einen Gruppe ansteigen, verringern sich die Konzentration der anderen, antikorrelierten Aminosäuren. Aus Abbildung 35b lassen sich erneut die zwei Hauptkorrelationscluster entnehmen. Zusätzlich werden die korrelativen Beziehungen innerhalb der beiden Hauptkorrelationscluster noch deutlicher sichtbar. So ergeben sich bspw. für die Gruppe Arg, Trp und Tyr, die Gruppe Val, Ile, Ala sowie die Gruppe Leu und Phe stärkere Korrelationen untereinander. Für die Aminosäuren des antikorrelierten Hauptclusters ergeben sich für die Gruppe Ser, Gln, Pro sowie für die Gruppe Asn, Asp, Thr, Gly stärkere Korrelationen untereinander.

Aminosäureverteilungsprofile von PPP-Mutanten in SM-Glucose

Für die Deletionsmutanten $\Delta zwf1$, $\Delta gnd1$, $\Delta tkl1$, $\Delta rpe1$ konnten keine Verteilungsprofile erstellt werden, da die Aminosäurekonzentrationen aufgrund von Wachstumsdefiziten der Mutanten innerhalb dieses Experiments unterhalb des Quantifizierungslimits lagen.

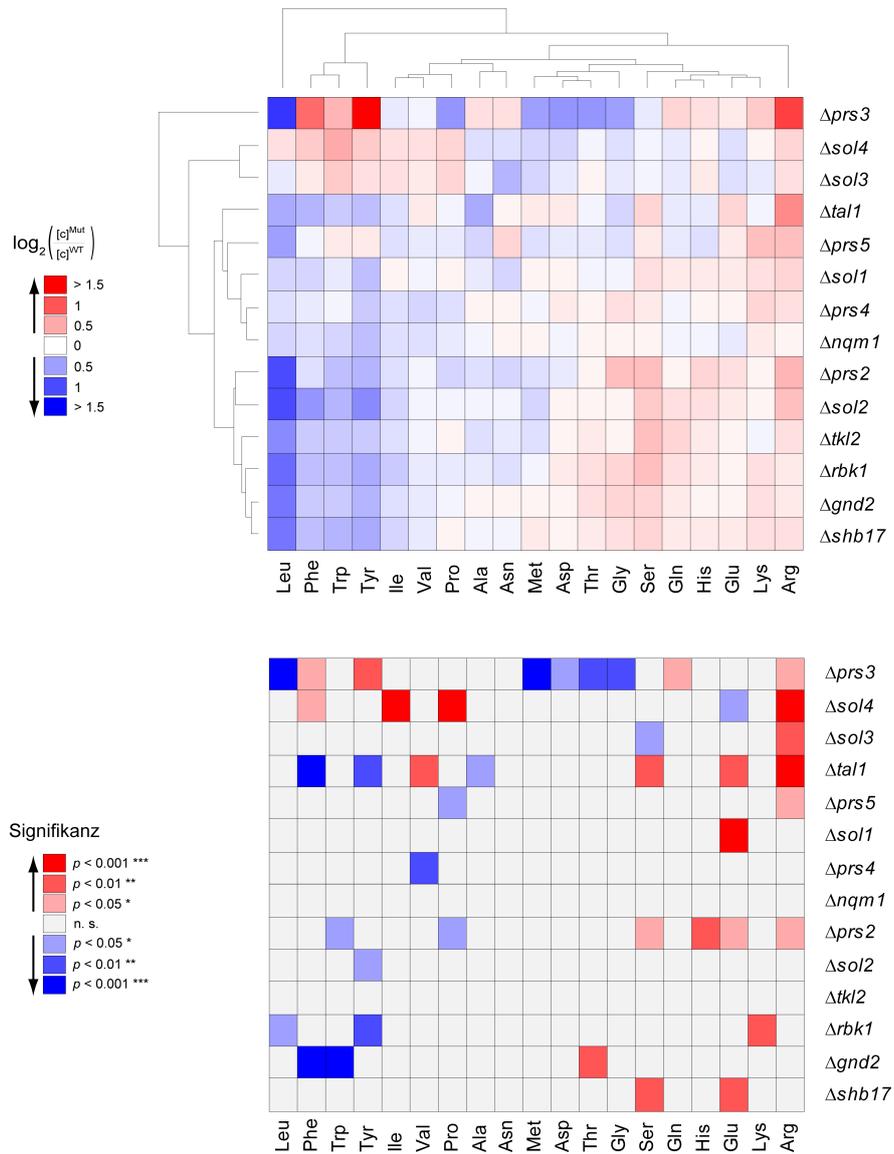


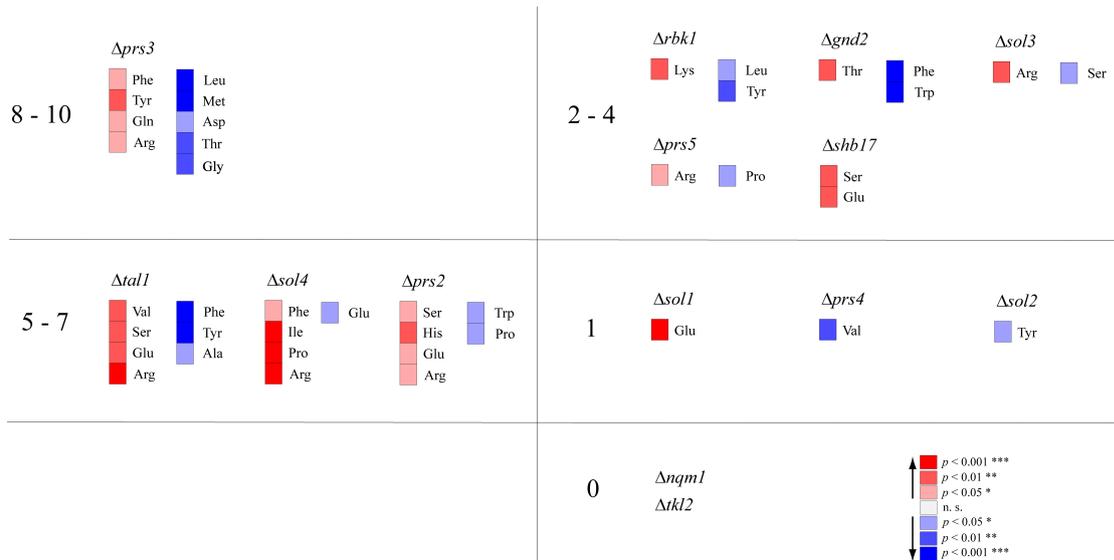
Abbildung 36: Aminosäureverteilungprofil von PPP-Mutanten in SM-Glucose. Aminosäureverteilungprofil von 14 PPP-Mutanten. Obere Heatmap: Die relativen Konzentrationen (als \log_2 (Ratio Mutante/Wildtyp)) sind als Heatmap dargestellt, wobei das Wildtyplevel (weiß), erhöhte Konzentrationen (rot), verringerte Konzentrationen (blau) farblich gekennzeichnet sind. Untere Heatmap: Die Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***) verdeutlichen die signifikant vom Wildtyp abweichenden Konzentrationen. $n=4$; Leu (Leucin), Tyr (Tyrosin), Trp (Tryptophan), Phe (Phenylalanin), Ile (Isoleucin), Val (Valin), Met (Methionin), Arg (Arginin), Ala (Alanin), Lys (Lysin), Asp (Aspartat), Thr (Threonin), Gly (Glycin), Gln (Glutamin), Pro (Prolin), Ser (Serin), His (Histidin), Glu (Glutamin), Asn (Asparagin).

Die in Abbildung 36 dargestellten Heatmaps lassen folgende Aussagen zu: Die maximalen Veränderungen in der Konzentration betragen im Allgemeinen nicht mehr als 1-fach (\log_2) der Konzentration des Wildtyps. Nur die Mutante $\Delta prs3$ wies Konzentrationsveränderungen bis über 1.4-fach (\log_2) auf. Der Großteil der beobach-

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

teten veränderten Aminosäurekonzentrationen war nicht signifikant unterschiedlich zur Wildtypkonzentration. Abbildung 37 fasst die Anzahl und Art der signifikanten Änderungen, ausgehend von Abbildung 36, spezifisch für jede Deletionsmutante übersichtlich zusammen.

a) Übersicht der signifikanten Änderungen in der jeweiligen Deletionsmutante



b) prozentuale Verteilung der veränderten Aminosäuren in den Deletionsmutanten

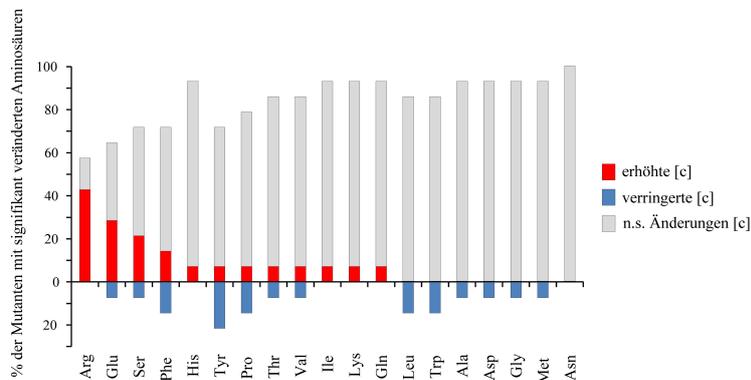


Abbildung 37: Signifikant veränderte Aminosäurekonzentrationen von PPP-Mutanten in SM-Glucose. a) Die Mutanten wurden entsprechend der Anzahl ihrer signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen gruppiert und die spezifisch veränderten Aminosäuren wurden, relativ zum Wildtyp, farblich gekennzeichnet. Wildtyp (weiß), Signifikant erhöhte Konzentrationen (rot), Signifikant verringerte Konzentrationen (blau). b) Prozentuale Verteilung der signifikant veränderten Aminosäuren über alle Mutanten. Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

Aus Abbildung 37a wird die hierarchische Abfolge der Deletionsmutanten entsprechend ihrer Anzahl an signifikant in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren

deutlich. So zeigten die Mutanten $\Delta prs3$ (9), $\Delta tal1$ (7), $\Delta sol4$ (5) und $\Delta prs2$ (6) unter dem Einfluss von Glucose die meisten in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren. Es folgen die Mutanten, bei denen weniger als $\frac{1}{4}$ der 19 untersuchten Aminosäuren in ihrer Konzentration verändert waren, d.h. es traten maximal 1-4 signifikante Änderungen auf. Diese Gruppe umfasst die Mutanten $\Delta rbk1$ (3), $\Delta gnd2$ (3), $\Delta sol3$ (2), $\Delta prs5$ (2), $\Delta shb17$ (2). Für die Gruppe bestehend aus den Mutanten $\Delta sol1$, $\Delta prs4$, und $\Delta sol2$ tritt nur eine veränderte Aminosäure auf. Die Mutanten $\Delta nqm1$, $\Delta tkl2$ zeigten keine signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen.

Aus Abbildung 37b wird erkennbar, welche Aminosäuren prozentual über alle Mutanten betrachtet am häufigsten von Konzentrationsänderungen betroffen waren. So zeigten 43% der Mutanten erhöhte Konzentrationen von Arginin, 29% von Glutamat, 21% von Serin, 14% von Phenylalanin sowie jeweils 7% von Histidin, Tyrosin, Prolin, Threonin, Valin, Isoleucin, Lysin und Glutamin. Die am häufigsten von negativen Änderungen (verringerte Konzentrationen) betroffenen Aminosäuren in den Mutanten waren Tyrosin bei 21% der Mutanten sowie Phenylalanin, Prolin, Leucin, Tryptophan bei jeweils 14% der Mutanten und Glutamin, Serin, Threonin, Valin, Alanin, Aspartat, Glycin und Methionin bei jeweils 7% der Mutanten. Leucin (Leu) und Valin (Val) bei jeweils 15% der Mutanten. Daraus ergibt sich, dass die Mutanten insgesamt am häufigsten von Änderungen in den Aminosäuren Arginin, Glutamat, Phenylalanin, Serin, Tyrosin und Prolin betroffen waren.

Nach Gruppierung der Aminosäuren entsprechend ihrer metabolischen Vorläufer (vgl. Abbildung 34) ergeben sich folgende Beobachtungen:

Die Mutanten, welche generell die häufigsten Änderungen aufwiesen ($\Delta prs3$, $\Delta tal1$, $\Delta sol4$, $\Delta prs2$), zeigten dabei die meisten veränderten Aminosäurekonzentrationen in den Vorläuferclustern ausgehend von PEP+E4P, α -KG, 3-PG sowie Pyr. Das OxAc-Cluster war weitestgehend nicht beeinflusst (nur bei $\Delta prs3$). Im Speziellen ließ sich bei der $\Delta prs3$ - Mutante erkennen, dass besonders die aromatischen Aminosäuren der Vorläufercluster PEP+E4P (Phe, Tyr) sowie die Aminosäuren ausgehend von α -KG (Arg, Gln) leicht erhöhte Konzentrationen zeigten. Reziprok dazu verhielten sich die Aminosäuren, welche aus den Metaboliten OxAc (Met, Asp, Thr), 3-PG (Gly) und Pyr (Leu) hervorgehen. Die Mutante $\Delta tal1$ wies für einzelne Vertreter der Vorläufer Pyr (Val), α -KG (Arg, Gln) und 3-PG (Ser) erhöhte Konzentrationen auf und wiederum für einen Vertreter aus dem Pyr-Cluster

(Ala) leichte sowie für die zwei aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr aus dem PEP+E4P - Cluster stark verringerte Konzentrationen auf. Die Mutante $\Delta sol4$ zeigte erhöhte Konzentrationen für Vertreter der Cluster PEP+E4P (Phe), OxAc (Ile) sowie für das α -KG - Cluster (Arg, Pro) und zusätzlich für Glu noch leicht verringerte Konzentrationen. Für die Mutante $\Delta prs2$ ergaben sich erhöhte Konzentrationen für die Vertreter aus den Clustern Ribulose-5-phosphat (R5P; His), 3-PG (Ser) sowie α -KG (Arg, Glu) und verringerte Konzentrationen aus den Clustern PEP+E4P (Trp) und erneut für einen Vertreter aus dem α -KG - Cluster (Pro).

Funktionelle paarweise Korrelationsanalyse der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Glucose

Für die PPP-Mutanten wurde analog zu den Glycolysemutanten ein Pearsonkorrelationsplot der Aminosäuren erstellt, um gegebenenfalls gemeinsame korrelative Beziehungen der Aminosäuren identifizieren zu können.

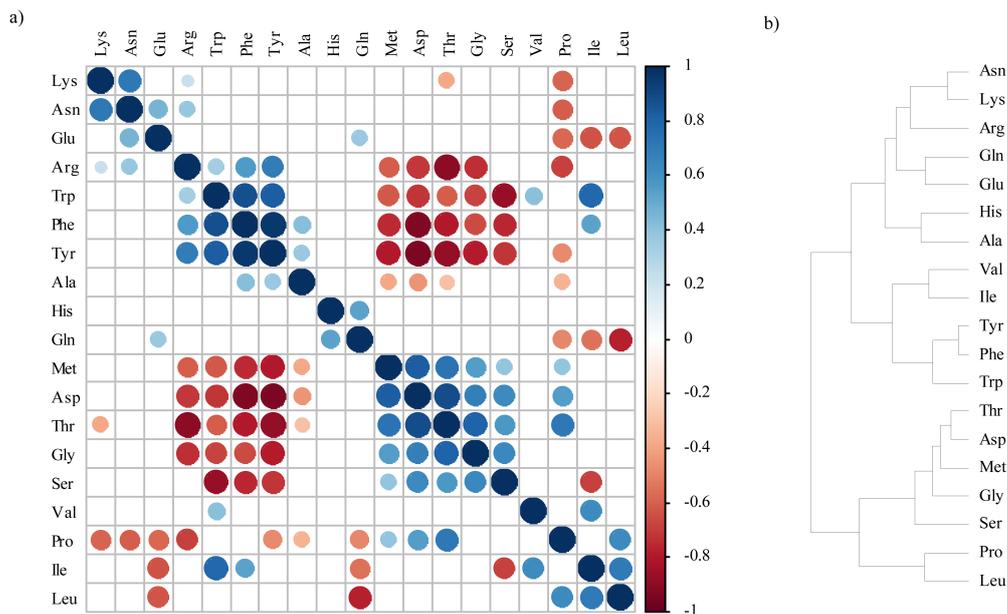


Abbildung 38: Pearsonkorrelationsdiagramm-/dendrogramm der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Glucose. a) Die paarweisen Korrelationswerte (Signifikanzschranke $p < 0.01$) von 19 Aminosäuren über 14 PPP-Mutanten nach Pearson. Negative Korrelation (rot), Positive Korrelation (blau). b) Das resultierende Korrelationsdendrogramm auf Basis der Korrelationswerte nach Pearson.

Für die PPP-Mutanten ergeben sich bezüglich der Aminosäurekorrelationen zwei kleinere Hauptkorrelationscluster. Das erste positiv korrelierte Cluster umfasst die

Aminosäuren Arg, Phe, Tyr, Trp. Das zweite positiv korrelierte Cluster umfasst die Aminosäuren Met, Asp, Thr, Gly und Ser. Beide Cluster stehen sich antikorrelativ gegenüber. Neben den beiden Hauptkorrelationsclustern treten weitere einzelne Korrelationen auf. So gibt es bspw. eine relativ starke positive Korrelation zwischen Lys und Asn sowie eine relativ starke negative Korrelation zwischen Pro und Lys, Asn, Glu und Arg. Die beiden Aminosäuren Glu und Gln zeigen neben der gemeinsamen Antikorrelation zu Prolin zudem eine negative Korrelation gegenüber Ile und Leu. Gegenüber Ile und Leu zeigt Prolin, gegensätzlich zu Gln und Glu, eher positive Korrelationen, was zudem noch für Asp und Thr zutrifft. Aus Abbildung 38b lassen sich erneut die zwei Hauptkorrelationscluster entnehmen. Zusätzlich werden die korrelativen Beziehungen innerhalb der beiden Hauptkorrelationscluster noch weiter in kleine Subcluster zerlegt. So ergeben sich bspw. für das Cluster, welches die aromatischen Aminosäuren Trp, Phe, Tyr enthält, stärkere Korrelationen zu Ile und Val als zu Arg, welches sich bevorzugt in Richtung des Lys und Asn - Clusters verschiebt. Die beständigste Korrelation bilden weiterhin die Aminosäuren des zweiten Hauptclusters (Thr, Asp, Met, Ser, Gly), welches sich zusätzlich näher an Pro und Leu gruppiert.

4.3.2.2 Aminosäureprofil von Glycolyse-/ PPP-Mutanten in SM-Galactose

Analog zu den für SM-Glucose gezeigten Analysen werden im Folgenden die Ergebnisse für die Kohlenstoffquelle Galactose dargestellt. Galactose zählt ebenfalls zu den fermentierbaren Kohlenstoffquellen und wirkt zusätzlich aktivierend auf die Respiration.

Aminosäureverteilungsprofile von Glycolysemutanten in SM-Galactose

Aufgrund des Wachstumsdefizits der Mutante $\Delta pgm2$ (vgl. Abbildung 30 bzw. Tabelle 22) konnten für diesen Deletionsstamm keine Aminosäuren quantifiziert werden.

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

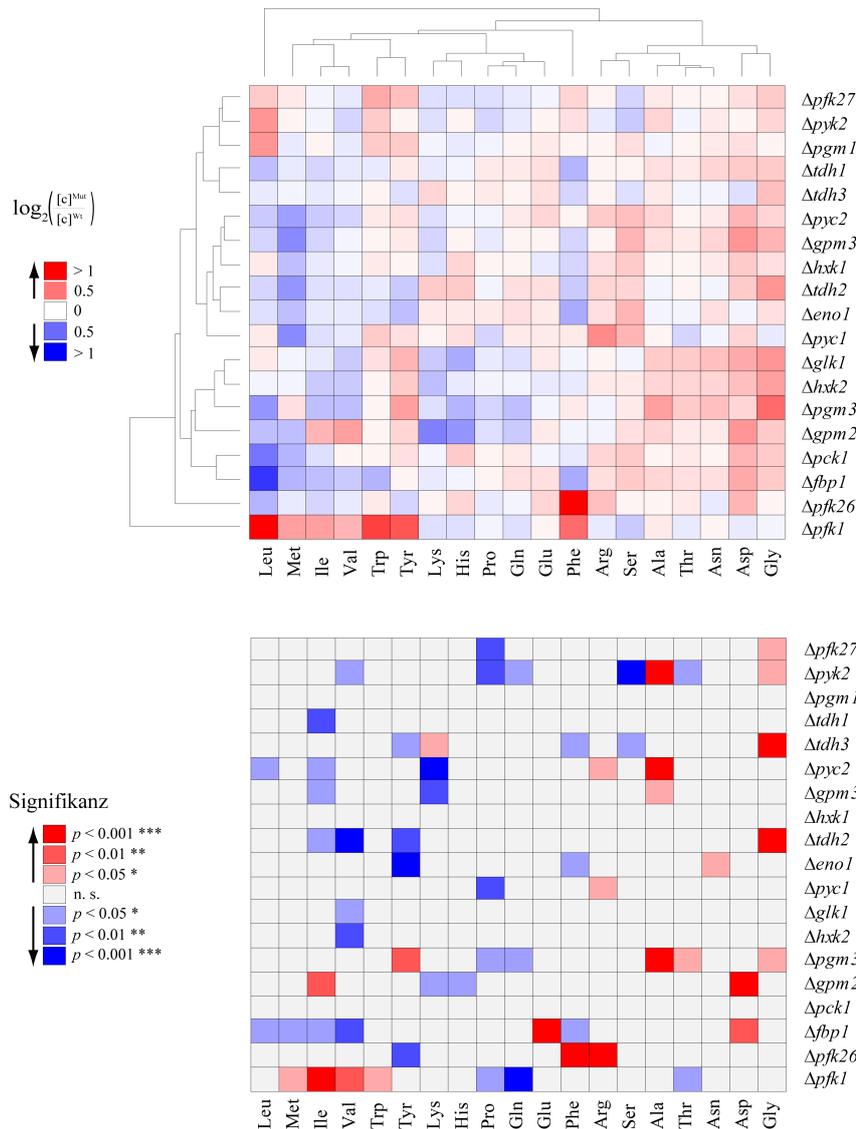
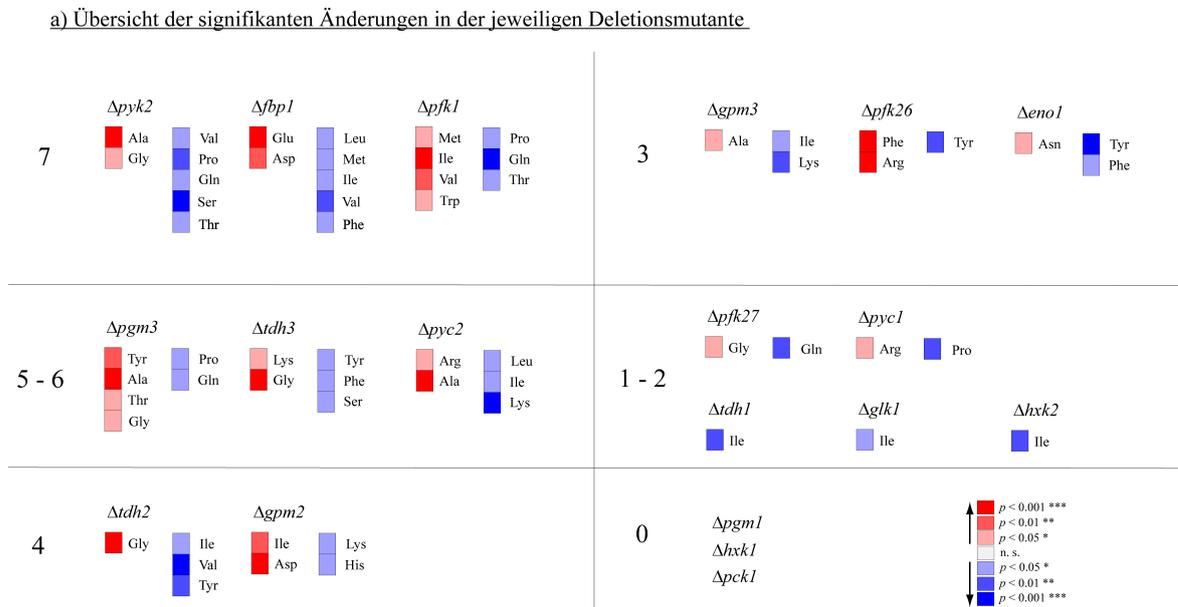


Abbildung 39: Aminosäureverteilungsprofil von Glycolysemutanten in SM-Galactose. Aminosäureverteilungsprofil von 19 Glycolysemutanten. Obere Heatmap: Die relativen Konzentrationen (als $\log_2(\text{Ratio Mutante/Wildtyp})$) sind als Heatmap dargestellt, wobei das Wildtyplevel (weiß), erhöhte Konzentrationen (rot), verringerte Konzentrationen (blau) farblich gekennzeichnet sind. Untere Heatmap: Die Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***) verdeutlichen die signifikant vom Wildtyp abweichenden Konzentrationen. $n=4$; Leu (Leucin), Tyr (Tyrosin), Trp (Tryptophan), Phe (Phenylalanin), Ile (Isoleucin), Val (Valin), Met (Methionin), Arg (Arginin), Ala (Alanin), Lys (Lysin), Asp (Aspartat), Thr (Threonin), Gly (Glycin), Gln (Glutamin), Pro (Prolin), Ser (Serin), His (Histidin), Glu (Glutamin), Asn (Asparagin).

Die maximalen Veränderungen in der Konzentration betragen im Allgemeinen nicht mehr als 1-fach (\log_2) der Konzentration des Wildtyps (Abbildung 39). Nur die Mutante $\Delta pfk1$ wies Konzentrationsveränderungen bis über 1.3-fach (\log_2) auf. Der Großteil der beobachteten veränderten Aminosäurekonzentrationen war nicht

4 Ergebnisse

signifikant unterschiedlich zur Wildtypkonzentration. Abbildung 40 fasst die Anzahl und Art der signifikanten Änderungen, ausgehend von Abbildung 39, spezifisch für jede Deletionsmutante übersichtlich zusammen:



b) prozentuale Verteilung der veränderten Aminosäuren in den Deletionsmutanten

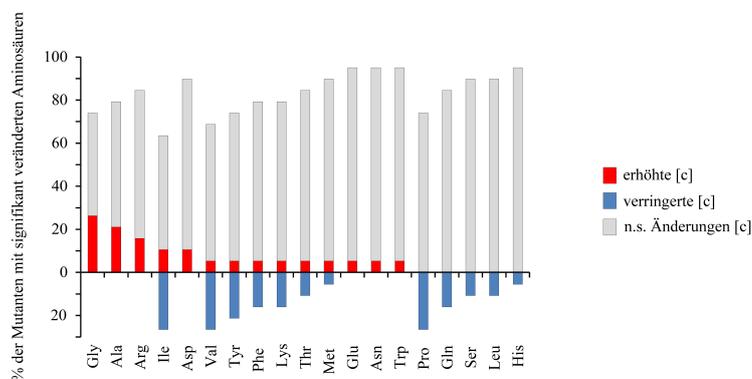


Abbildung 40: Signifikant veränderte Aminosäurekonzentrationen von Glycolysemutanten in SM-Galactose. a) Die Mutanten wurden entsprechend der Anzahl der signifikant veränderten Aminosäurekonzentration gruppiert und die spezifisch veränderten Konzentrationen wurden, relativ zum Wildtyp, farblich gekennzeichnet. Wildtyp (weiß), Signifikant erhöhte Konzentrationen (rot), Signifikant verringerte Konzentrationen (blau). b) Prozentuale Verteilung der signifikant veränderten Aminosäuren über alle Mutanten. Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

In Abbildung 40a wird die hierarchische Abfolge der Deletionsmutanten entsprechend ihrer Anzahl an signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen deutlich.

So zeigten die Mutanten $\Delta pyk2$ (7), $\Delta fbp1$ (7), $\Delta pfk1$ (7) und $\Delta pgm3$ (6) unter dem Einfluss von Glucose die meisten in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren. Es folgen die Mutanten, bei denen weniger als $\frac{1}{4}$ der 19 untersuchten Aminosäuren in ihrer Konzentration verändert waren, d.h. es traten maximal 1-5 signifikant veränderte Aminosäuren auf. Diese Gruppe umfasst die Mutanten $\Delta tdh3$ (5), $\Delta pyc2$ (5), $\Delta tdh2$ (4), $\Delta gpm2$ (4), $\Delta gpm3$ (3), $\Delta pfk26$ (3), $\Delta eno1$ (3), $\Delta pfk27$ (2), $\Delta pyc1$ (2). Für die Gruppe bestehend aus den Mutanten $\Delta tdh1$, $\Delta glk1$, $\Delta hck2$ trat nur eine veränderte Aminosäure auf. Die Mutanten $\Delta pgm1$, $\Delta hck1$, $\Delta pck1$ zeigten keine signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen.

Aus Abbildung 40b wird erkennbar, welche Aminosäuren prozentual über alle Mutanten betrachtet am häufigsten von Konzentrationsänderungen betroffen waren. So zeigten 26% der Mutanten erhöhte Konzentrationen von Glycin, 21% von Alanin, 16% von Arginin. Jeweils 10% der Mutanten zeigten erhöhte Konzentrationen von Arginin und Isoleucin und jeweils 5% der Mutanten wiesen erhöhte Konzentrationen von Valin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, Threonin, Methionin, Glutamat, Asparagin und Tryptophan auf. Die am häufigsten von negativen Änderungen (verringerte Konzentrationen) betroffenen Aminosäuren in den Mutanten waren Isoleucin, Valin und Prolin bei 26% der Mutanten sowie Tyrosin bei 21% und Phenylalanin, Lysin und Glutamin bei jeweils 16% der Mutanten. Zusätzlich zeigten jeweils 10% der Mutanten verringerte Konzentrationen von Threonin, Serin und Leucin und weitere 5% der Mutanten jeweils verringerte Konzentrationen von Methionin und Histidin. Daraus ergibt sich, dass die Mutanten insgesamt am häufigsten von Änderungen in den Aminosäuren Isoleucin, Valin, Glycin, Tyrosin, Phenylalanin, Lysin, und Alanin betroffen waren.

Nach Gruppierung der Aminosäuren entsprechend ihrer metabolischen Vorläufer (vgl. Abbildung 34) ergeben sich folgende Beobachtungen: Die Mutanten, welche generell die häufigsten Änderungen aufwiesen ($\Delta pyk2$, $\Delta fbp1$, $\Delta pfk1$, $\Delta pgm3$), zeigten dabei die meisten in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren in den Vorläuferclustern ausgehend von Pyruvat, 3-Phosphoglycerat, Oxalacetat sowie α -Ketoglutarat. Im Speziellen ließ sich bei der $\Delta pyk2$ - Mutante erkennen, dass Vertreter der Aminosäuren aus den Vorläuferclustern Pyr (Ala) sowie 3-PG (Gly) leicht erhöhte Konzentrationen zeigten. Reziprok dazu verhielten sich die Aminosäuren, welche aus den Metaboliten OxAc (Thr), α -KG (Pro, Gln) und erneut aus 3-PG (Ser) hervorgehen. Die Mutante $\Delta fbp1$ wies für einzelne Vertreter der Vorläufer

4 Ergebnisse

OxAc (Asp) und α -KG (Glu) erhöhte Konzentrationen auf und zeigte für Vertreter aus den Vorläuferclustern Pyr (Leu, Val), OxAc (Met, Ile) sowie für Phe aus dem PEP+E4P - Cluster verringerte Konzentrationen. Die Mutante $\Delta pfk1$ verhielt sich teilweise invers zur $\Delta fbp1$ - Mutante, was an den erhöhten Konzentrationen von Ile, Met, Val und Trp (aus den Vorläufern OxAc, Pyr und PEP+E4P) erkennbar war. Ebenfalls teilweise invers zu den, in ihrer Konzentration erhöhten Aminosäuren der $\Delta fbp1$ - Mutante, sind die Aminosäuren, welche in der $\Delta pfk1$ - Mutante in verringerter Konzentration vorlagen, namentlich Pro, Gln und Thr (aus den Vorläufern α -KG und OxAc). Für die Mutante $\Delta pgm3$ ergeben sich erhöhte Konzentrationen für die Vertreter aus den Clustern OxAc (Thr), Pyr (Ala), PEP+E4P (Tyr) und 3-PG (Gly) sowie verringerte Konzentrationen für Aminosäuren aus dem Vorläufercluster α -KG (Pro, Gln).

Funktionelle paarweise Korrelationsanalyse der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Galactose

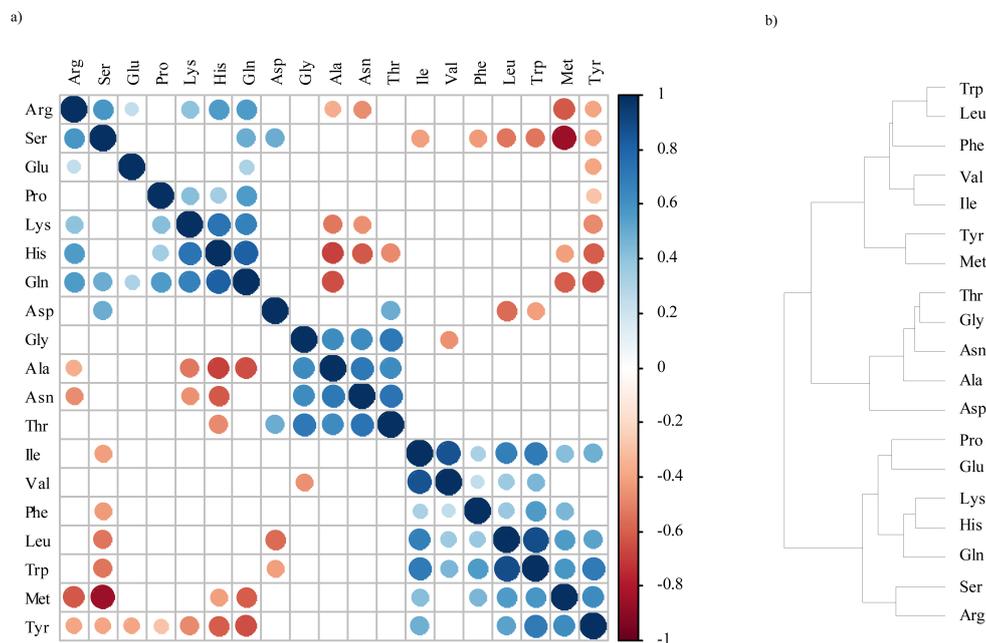


Abbildung 41: Pearsonkorrelationsdiagramm- / dendrogramm der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Galactose. a) Die paarweisen Korrelationswerte (Signifikanzschränke $p < 0.01$) von 19 Aminosäuren über 19 Glycolysemutanten nach Pearson. Negative Korrelation (rot), Positive Korrelation (blau). b) Das resultierende Korrelationsdendrogramm auf Basis der Korrelationswerte nach Pearson.

Für die Glycolysemutanten ergeben sich unter Galactose für die Aminosäuren zwei kleinere Hauptkorrelationscluster mit sehr hohen Positivkorrelationen sowie ein größeres ebenfalls positiv korreliertes Cluster. Das eine kleinere Cluster wird gebildet durch Pro, Lys, His und Gln, wobei die Korrelation zwischen den drei zuletzt genannten Aminosäuren am stärksten positiv ist. Das zweite kleinere Cluster umfasst die Aminosäuren Gly, Ala, Asn und Thr mit ungefähr gleich stark positiver Korrelation zwischen den einzelnen Aminosäuren dieser Gruppe. Das etwas größere und zudem erneut positiv korrelierte Cluster umfasst die Aminosäuren Ile, Val, Phe, Leu, Trp, Met und Tyr. Hier sind erneut die letzten vier Aminosäuren und zusätzlich die Paarung Ile und Val am stärksten positiv korreliert. Besonders auffällige negative Korrelationen bestehen besonders für Tyr gegenüber Arg, Ser, Glu und zudem gegenüber den Aminosäuren aus dem ersten kleinen Cluster (Pro, Lys, His, Gln). Weiterhin treten vereinzelt noch stark negative Korrelationen zwischen His und Ala bzw. Asn sowie zwischen Gln und Ala und zuletzt zwischen Met und Arg bzw. Ser auf. Aus Abbildung 41b lassen sich erneut die drei Hauptkorrelationscluster entnehmen. Zusätzlich werden die korrelativen Beziehungen innerhalb der beiden Hauptkorrelationscluster noch weiter in kleine Subcluster zerlegt, sodass die stärksten Korrelationen innerhalb der drei Hauptcluster, bspw. zwischen Lys, His und Gln oder Leu, Trp bzw. Gly, Ala, Asn und Thr, noch deutlicher hervorgehoben werden.

Aminosäureverteilungsprofile von PPP-Mutanten ins SM-Galactose

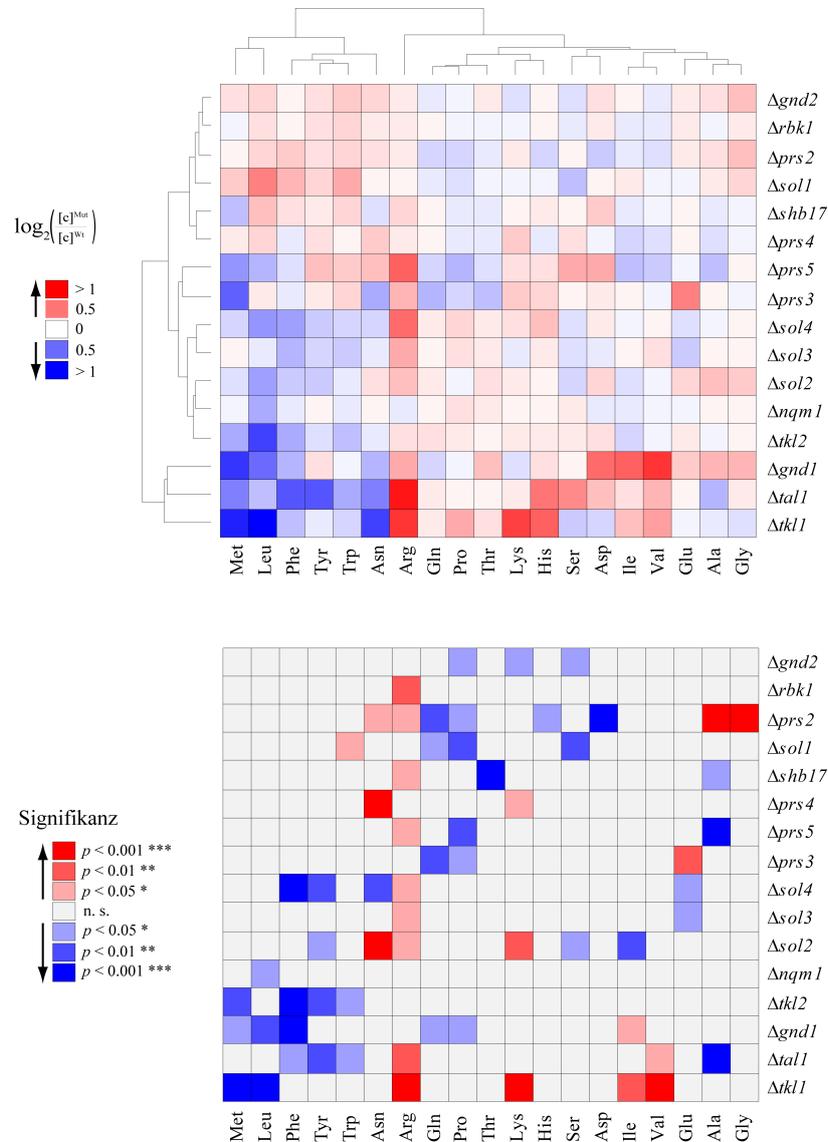


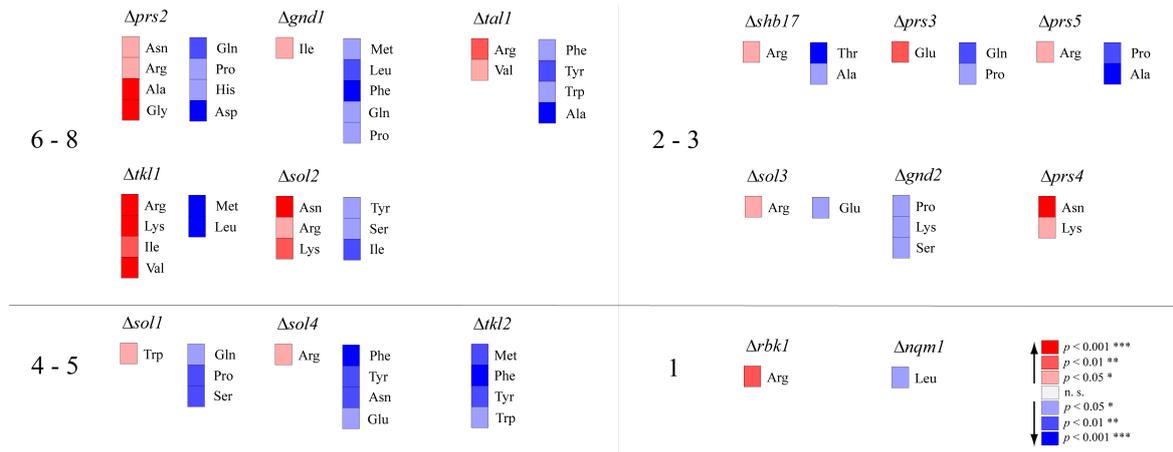
Abbildung 42: Aminosäureverteilungsprofil von PPP-Mutanten in SM-Galactose. Aminosäureverteilungsprofil von 16 PPP-Mutanten. Obere Heatmap: Die relativen Konzentrationen (als \log_2 (Ratio Mutante/Wildtyp)) sind als Heatmap dargestellt, wobei das Wildtyplevel (weiß), erhöhte Konzentrationen (rot), verringerte Konzentrationen (blau) farblich gekennzeichnet sind. Untere Heatmap: Die Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***) verdeutlichen die signifikant vom Wildtyp abweichenden Konzentrationen. n=4; Leu (Leucin), Tyr (Tyrosin), Trp (Tryptophan), Phe (Phenylalanin), Ile (Isoleucin), Val (Valin), Met (Methionin), Arg (Arginin), Ala (Alanin), Lys (Lysin), Asp (Aspartat), Thr (Threonin), Gly (Glycin), Gln (Glutamin), Pro (Prolin), Ser (Serin), His (Histidin), Glu (Glutamin), Asn (Asparagin).

Die maximalen Veränderungen in der Konzentration betragen im Allgemeinen nicht mehr als 1-fach (\log_2) der Konzentration des Wildtyps (Abbildung 42). Nur die Mutante $\Delta tk11$ wies Konzentrationsveränderungen bis ~ -1.2 -fach (\log_2) für

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

Leucin auf. Der Großteil der beobachteten veränderten Aminosäurekonzentrationen unterschied sich nicht signifikant von der Wildtypkonzentration. Abbildung 43 fasst die Anzahl und Art der signifikanten Änderungen, ausgehend von Abbildung 42, spezifisch für jede Deletionsmutante übersichtlich zusammen.

a) Übersicht der signifikanten Änderungen in der jeweiligen Deletionsmutante



b) prozentuale Verteilung der veränderten Aminosäuren in den Deletionsmutanten

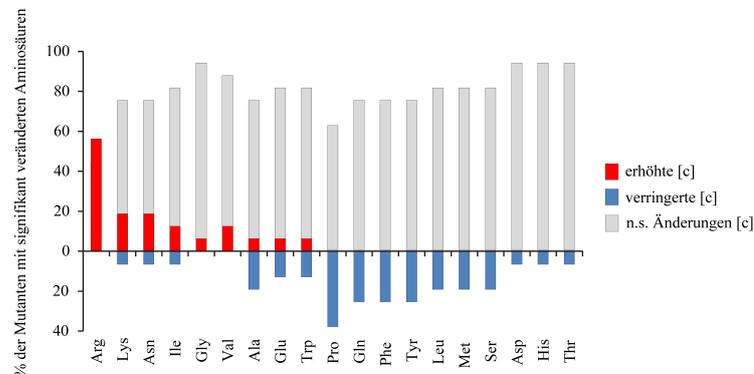


Abbildung 43: Signifikant veränderte Aminosäurekonzentrationen von PPP-Mutanten in SM-Galactose. a) Die Mutanten wurden entsprechend der Anzahl ihrer signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen gruppiert und die spezifisch veränderten Konzentrationen wurden, relativ zum Wildtyp, farblich gekennzeichnet. Wildtyp (weiß), Signifikant erhöhte Konzentrationen (rot), Signifikant verringerte Konzentrationen (blau). b) Prozentuale Verteilung der signifikant veränderten Aminosäuren über alle Mutanten. Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

Aus Abbildung 43a wird die hierarchische Abfolge der Deletionsmutanten entsprechend ihrer Anzahl an signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen deutlich. So zeigten die Mutanten $\Delta prs2$ (8), $\Delta gnd1$ (6), $\Delta tal1$ (6), $\Delta tkl1$ (6) und $\Delta sol2$ (6)

unter dem Einfluss von Glucose die meisten in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren. Es folgen die Mutanten, bei denen weniger als $\frac{1}{4}$ der 19 untersuchten Aminosäuren in ihrer Konzentration verändert waren, d.h. es traten maximal 1-5 signifikant veränderte Konzentrationen auf. Diese Gruppe umfasst die Mutanten $\Delta sol1$ (4), $\Delta sol4$ (5), $\Delta tkl2$ (4). Es folgt die Gruppe mit 2-3 Änderungen: $\Delta shb17$ (3), $\Delta prs3$ (3), $\Delta prs5$ (3), $\Delta sol3$ (2), $\Delta gnd2$ (3) $\Delta prs4$ (2). Für die Gruppe bestehend aus den Mutanten $\Delta rbk1$ und $\Delta nqm1$ trat nur eine veränderte Aminosäure auf. Unter all den untersuchten Mutanten fand sich im Minimum stets eine veränderte Aminosäure. Zudem ist auffallend, dass in der Gruppe der Δprs - Mutanten die Mutante $\Delta prs2$ die meisten Änderungen aufwies, während ihre Isoformen bedeutend weniger Änderungen zeigten. Genaue Übereinstimmungen gibt es für die Δprs - Mutantengruppe nur bei Prolin. Die Gruppe der Δsol - Mutanten zeigte in etwa gleich viele Veränderungen zwischen den Isoformen, jedoch waren meist unterschiedliche Aminosäuren betroffen.

Aus Abbildung 43b wird erkennbar, welche Aminosäuren prozentual über alle Mutanten betrachtet am häufigsten von Konzentrationsänderungen betroffen waren. So zeigten 56% der Mutanten erhöhte Konzentrationen von Arginin, je 19% von Lysin und Asparagin, je 12% von Isoleucin und Valin sowie jeweils 6% von Glycin, Alanin, Glutamat und Tryptophan. Die am häufigsten von negativen Änderungen (verringerte Konzentrationen) betroffenen Aminosäuren in den Mutanten waren Prolin bei 37% der Mutanten sowie Glutamin, Phenylalanin, Tyrosin bei jeweils 25% der Mutanten, Alanin, Leucin, Methionin, Serin bei jeweils 19%, Glutamat und Tryptophan bei 12% sowie Lysin, Asparagin, Isoleucin, Aspartat, Histidin und Threonin bei jeweils 6% der Mutanten. Daraus ergibt sich, dass die Mutanten insgesamt am häufigsten von Konzentrationsänderungen in den Aminosäuren Arginin, Prolin gefolgt von Alanin, Phenylalanin, Lysin, Asparagin, Glutamin und Tyrosin betroffen waren.

Nach Gruppierung der Aminosäuren entsprechend ihrer metabolischen Vorläufer (vgl. Abbildung 34) ergeben sich folgende Beobachtungen:

Die Mutanten, welche generell die häufigsten Änderungen aufwiesen ($\Delta prs2$, $\Delta gnd1$, $\Delta tal1$, $\Delta tkl1$, $\Delta sol2$), zeigten dabei die meisten in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren in den Vorläuferclustern ausgehend von Phosphoenolpyruvat+E4P, α -Ketoglutarat, 3-Phosphoglycerat, Pyruvat und Oxalacetat. Die Aminosäuren der Cluster 3-PG (Trp, Phe, Tyr) sowie einiger Vertreter des α -KG - Clusters (Gln, Pro)

waren zudem häufig in ihrer Konzentration verringert. Im Speziellen ließ sich bei der $\Delta prs2$ - Mutante erkennen, dass jeweils ein Vertreter der Vorläufercluster α -KG (Arg), Pyr (Ala), OxAc (Asn) sowie 3-PG (Gly) erhöhte Konzentrationen zeigte. Reziprok dazu verhielten sich die Aminosäuren der Vorläufercluster α -KG (Gln, Pro) sowie Vertreter des Ribulose-5-phosphat-Clusters (His) und OxAc (Asp), welche in verringerten Konzentrationen vorlagen. Die Mutante $\Delta gnd1$ wies nur für Ile (aus dem OxAc-Cluster) erhöhte Konzentrationen auf. Verringerte Konzentrationen fanden sich für Met (aus OxAc), für Leu (aus Pyr), für Phe (aus PEP+E4P) sowie für zwei Aminosäuren aus dem α -KG - Cluster (Pro, Gln). Die Mutante $\Delta tal1$ zeigte erhöhte Konzentrationen für Vertreter der Cluster α -KG (Arg) und Pyr (Val) und verringerte Konzentrationen für die aromatischen Aminosäuren Trp, Phe, Tyr aus dem PEP+E4P - Cluster und Ala aus dem Pyr - Cluster. Für die Mutante $\Delta tkl1$ ergaben sich ebenfalls erhöhte Konzentrationen für die Vertreter aus den Clustern Pyr (Val), OxAc (Ile, Lys) und α -KG (Arg) und verringerte Konzentrationen aus den Clustern OxAc (Met) und Pyr (Leu). Bezüglich der $\Delta sol2$ - Mutante ergaben sich erhöhte Konzentrationen in den Clustern OxAc (für Asn und Lys) und α -KG (Arg) und verringerte Konzentrationen für Ile, Ser und Tyr aus den Clustern OxAc, 3-PG sowie PEP+E4P.

Funktionelle paarweise Korrelationsanalyse der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Galactose

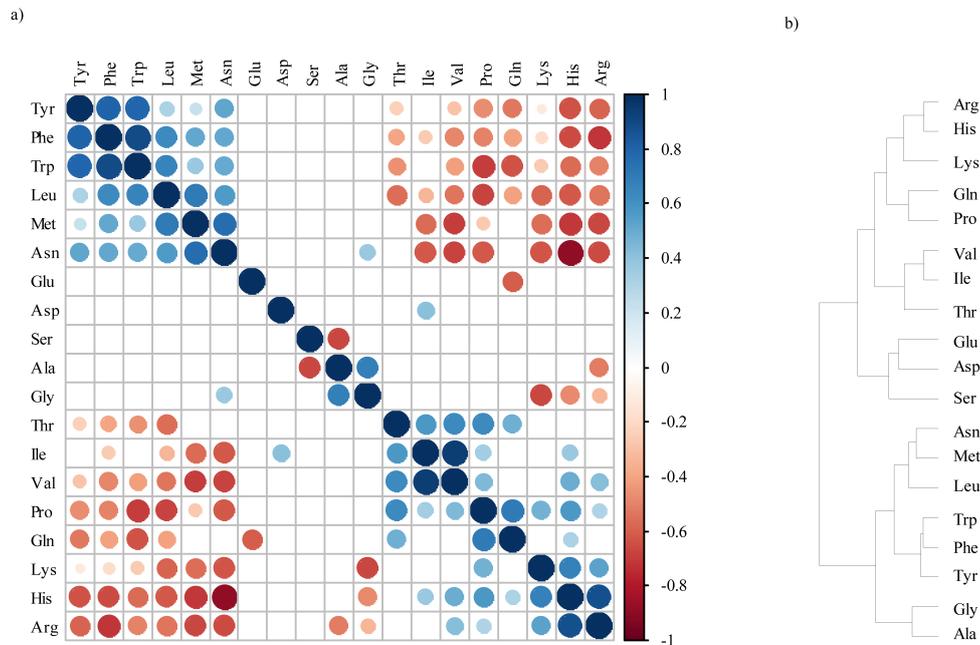


Abbildung 44: Pearsonkorrelationsdiagramm-/dendrogramm der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Galactose. a) Die paarweisen Korrelationswerte (Signifikanzschranke $p < 0.01$) von 19 Aminosäuren über 16 PPP-Mutanten nach Pearson. Negative Korrelation (rot), Positive Korrelation (blau). b) Das resultierende Korrelationsdendrogramm auf Basis der Korrelationswerte nach Pearson.

Für die PPP-Mutanten ergeben sich aus Abbildung 44a zwei Hauptkorrelationscluster. Das erste positiv korrelierte Cluster umfasst die Aminosäuren Tyr, Phe, Trp, Leu, Met und Asn. Das zweite positiv korrelierte Cluster umfasst die Aminosäuren Thr, Ile, Val, Pro, Gln, Lys, His, Arg. Die Korrelationen untereinander sind im Vergleich der beiden Hauptcluster bei Cluster 1 stärker. Cluster 1 und Cluster 2 sind weitestgehend antikorrelativ zueinander aufgestellt. Aus Abbildung 44b ergeben sich besonders für das Cluster 2 deutlichere Zusammenhänge. Man erkennt, dass besonders die Gruppe Thr, Ile, Val sowie die Gruppe Lys, His, Arg starke Korrelationen untereinander aufzeigen. Zudem liegt bei Pro und Gln ebenfalls eine stark positive Korrelation vor. Die stärksten Korrelationen aus Cluster 1 betreffen einerseits die aromatischen Aminosäuren sowie die aus Leu, Met und Asn bestehende Gruppe.

4.3.2.3 Aminosäureprofil von Glycolyse- / PPP-Mutanten in SM-Ethanol

Im Folgenden sind die Aminosäureverteilungsprofile für die Kohlenstoffquelle Ethanol dargestellt. Ethanol zählt zu den nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen und wird demnach über Respiration metabolisiert. Zusätzlich erfolgt unter dem Einfluss von Ethanol eine Aktivierung der Gluconeogenese zum Aufbau von Glucose.

Aminosäureverteilungsprofile von Glycolysemutanten in SM-Ethanol

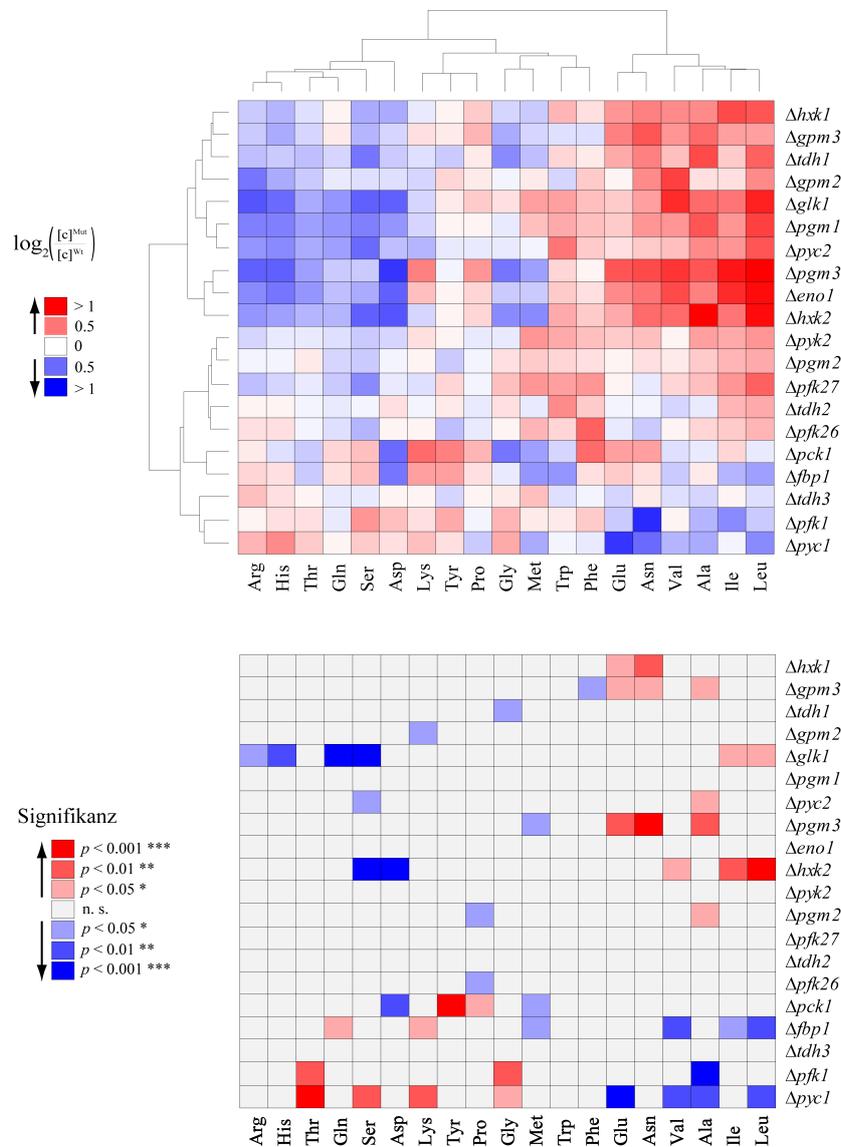


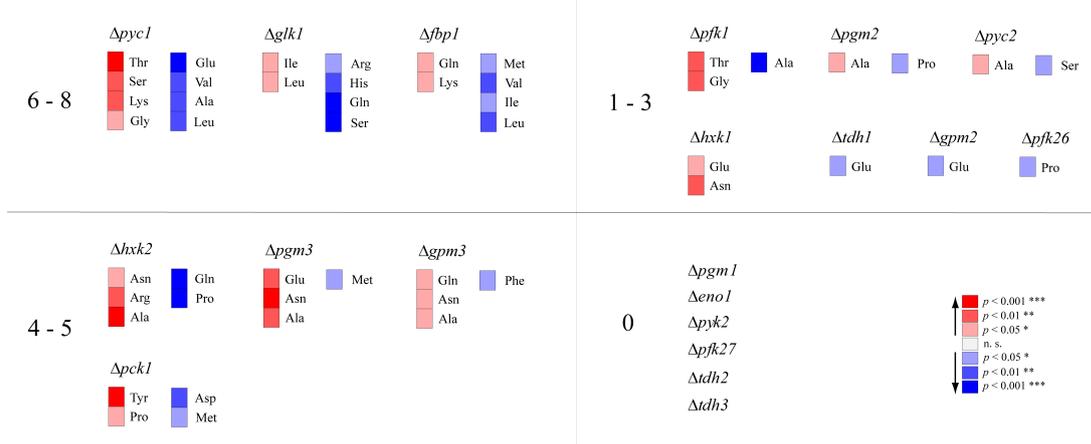
Abbildung 45: Aminosäureverteilungsprofil von Glycolysemutanten in SM-Ethanol. Aminosäureverteilungsprofil von 20 Glycolysemutanten. Obere Heatmap: Die relativen Konzentrationen (als \log_2 (Ratio Mutante/Wildtyp)) sind als Heatmap dargestellt, wobei das Wildtyplevel (weiß), erhöhte Konzentrationen (rot), verringerte Konzentrationen (blau) farblich gekennzeichnet sind. Untere Heatmap: Die Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***) verdeutlichen die signifikant vom Wildtyp abweichenden Konzentrationen. $n=4$; Leu (Leucin), Tyr (Tyrosin), Trp (Tryptophan), Phe (Phenylalanin), Ile (Isoleucin), Val (Valin), Met (Methionin), Arg (Arginin), Ala (Alanin), Lys (Lysin), Asp (Aspartat), Thr (Threonin), Gly (Glycin), Gln (Glutamin), Pro (Prolin), Ser (Serin), His (Histidin), Glu (Glutamin), Asn (Asparagin).

Die maximalen Veränderungen in der Konzentration betragen im Allgemeinen nicht mehr als 1-fach (\log_2) der Konzentration des Wildtyps (Abbildung 45). Der Großteil der beobachteten veränderten Aminosäurekonzentrationen unterschied sich jedoch

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

nicht signifikant von der Wildtypkonzentration. Abbildung 46 fasst die Anzahl und Art der signifikanten Änderungen, ausgehend von Abbildung 45, spezifisch für jede Deletionsmutante, übersichtlich zusammen.

a) Übersicht der signifikanten Änderungen in der jeweiligen Deletionsmutante



b) Prozentuale Verteilung der veränderten Aminosäuren in den Deletionsmutanten

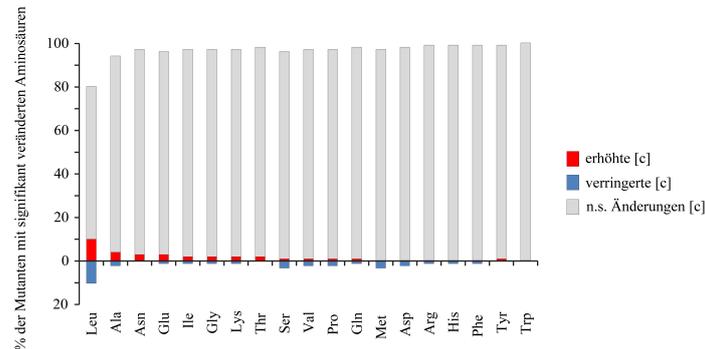


Abbildung 46: Signifikant veränderte Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Ethanol. a) Die Mutanten wurden entsprechend der Anzahl ihrer signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen gruppiert und die spezifisch veränderten Konzentrationen wurden, relativ zum Wildtyp, farblich gekennzeichnet. Wildtyp (weiß), Signifikant erhöhte Konzentrationen (rot), Signifikant verringerte Konzentrationen (blau). b) Prozentuale Verteilung der signifikant veränderten Aminosäuren über alle Mutanten. Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

Aus Abbildung 46a wird die hierarchische Abfolge der Deletionsmutanten entsprechend ihrer Anzahl an signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen deutlich. So zeigten die Mutanten $\Delta pyc1$ (8), $\Delta glk1$ (6), $\Delta fbp1$ (6) unter dem Einfluss von Ethanol die meisten in ihrer Konzentration veränderten Aminosäuren. Es folgen die Mutanten, bei denen weniger als $1/4$ der 19 untersuchten Aminosäuren in ihrer Konzentration verändert waren, d.h. es traten maximal 1-5 signifikant veränderte

Aminosäuren auf. Diese Gruppe umfasst die Mutanten $\Delta hck2$ (5), $\Delta pgm3$ (4), $\Delta gpm3$ (4), $\Delta pck1$ (4), $\Delta pfk1$ (3). Für die Gruppe bestehend aus den Mutanten $\Delta pgm2$ (2), $\Delta pyc2$ (2), $\Delta hck1$ (2), $\Delta tdh1$ (1), $\Delta gpm2$ (1) und $\Delta pfk26$ (1) traten 1-2 veränderte Aminosäuren. Die Mutanten $\Delta pgm1$, $\Delta eno1$, $\Delta pyk2$, $\Delta pfk27$, $\Delta tdh2$, $\Delta tdh3$ zeigten keine signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen und wiesen somit zum Wildtyp vergleichbare Konzentrationen auf.

Aus Abbildung 46b wird erkennbar, welche Aminosäuren prozentual, über alle Mutanten betrachtet, am häufigsten von Konzentrationsänderungen betroffen waren. So zeigten 10% der Mutanten erhöhte Konzentrationen von Leucin, 4% von Alanin, 3% von Asparagin und Glutamat, 2% von Isoleucin, Glycin, Lysin und Threonin sowie jeweils 1% von Serin, Valin, Prolin, Glutamin und Tyrosin. Die am häufigsten von negativen Änderungen (verringerte Konzentrationen) betroffenen Aminosäuren in den Mutanten waren u.a. ebenfalls Leucin bei 10% der Mutanten sowie Serin und Methionin bei jeweils 3% der Mutanten, Alanin, Valin, Prolin und Aspartat bei jeweils 2% und Glutamat, Isoleucin, Glycin, Lysin, Glutamin, Arginin, Histidin und Phenylalanin bei jeweils nur 1% der Mutanten. Daraus ergibt sich, dass die Mutanten insgesamt am häufigsten von Konzentrationsänderungen in den Aminosäuren Leucin und Alanin betroffen waren, wobei dies nur einen kleinen Anteil der Mutanten betraf.

Nach Gruppierung der Aminosäuren entsprechend ihrer metabolischen Vorläufer (vgl. Abbildung 34) ergeben sich folgende Beobachtungen:

Die Mutanten, welche generell die häufigsten Änderungen aufweisen ($\Delta pyc1$, $\Delta glk1$, $\Delta fbp1$), zeigten dabei die meisten veränderten Aminosäurekonzentrationen in den Vorläuferclustern ausgehend von Oxalacetat, α -Ketoglutarat, 3-Phosphoglycerat sowie Pyruvat. Im Speziellen ließ sich bei der $\Delta pyc1$ - Mutante erkennen, dass besonders jeweils ein Vertreter aus dem Cluster OxAc (Lys) und α -KG (Thr) sowie die beiden Aminosäuren Ser und Gly aus dem 3-PG - Cluster erhöhte Konzentrationen zeigten. Reziprok dazu (stark verringerte Konzentrationen) verhielten sich die Aminosäuren Leu, Val, Ala (aus dem Pyr - Cluster) sowie Glu (ausgehend von α -KG). Die Mutante $\Delta glk1$ wies für einzelne Vertreter der Vorläufer Pyr (Leu) und OxAc (Ile) erhöhte Konzentrationen auf und wiederum für Vertreter aus dem α -KG - Cluster (Arg, Gln) sowie für Ser (aus 3-PG) und His (aus Ribulose-5-phosphat (R5P)) teilweise stark verringerte Konzentrationen auf. Die Mutante $\Delta fbp1$ zeigte ebenfalls (ähnlich zur Mutante $\Delta pyc1$) für je einen Vertreter der Cluster OxAc

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

(Lys) und α -KG (Gln) erhöhte Konzentrationen auf und zeigte zudem noch leicht bis stark verringerte Konzentrationen für Met und Ile (aus OxAc) sowie Val und Leu (aus Pyr).

Funktionelle paarweise Korrelationsanalyse der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Ethanol

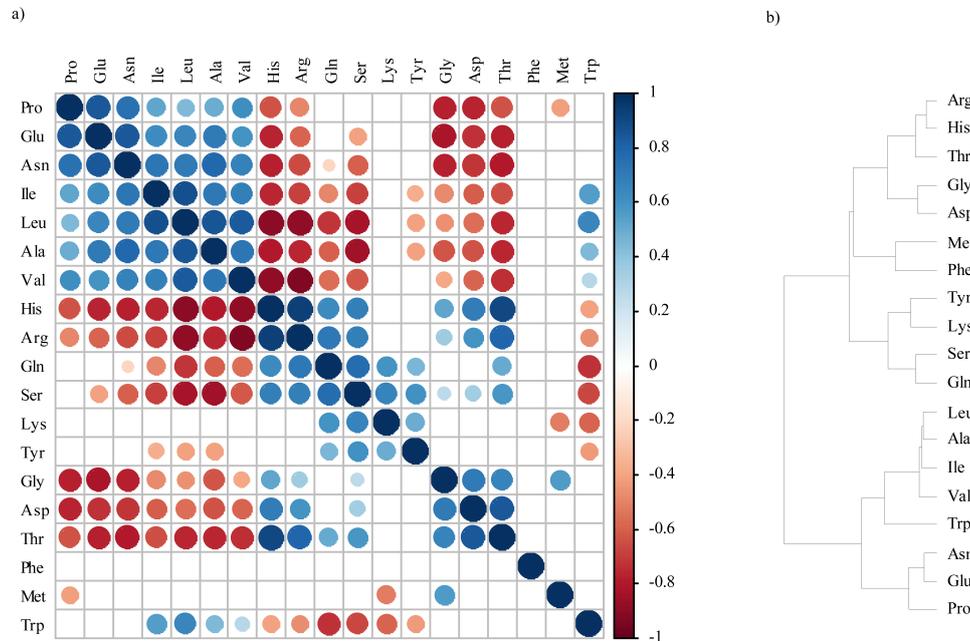


Abbildung 47: Pearsonkorrelationsdiagramm- und dendrogramm der Aminosäuren von Glycolysemutanten in SM-Ethanol. a) Die paarweisen Korrelationswerte (Signifikanzschranke $p < 0.01$) von 19 Aminosäuren über 20 Glycolysemutanten nach Pearson. Negative Korrelation (rot), Positive Korrelation (blau). b) Das resultierende Korrelationsdendrogramm auf Basis der Korrelationswerte nach Pearson.

Für die Glycolysemutanten ergeben sich zwei Hauptkorrelationscluster. Das erste positiv korrelierte Cluster umfasst die Aminosäuren Pro, Glu, Asn, Ile, Leu, Ala und Val und zeigt starke Korrelationen der Aminosäuren untereinander. Das zweite positiv korrelierte Cluster umfasst die Aminosäuren His, Arg, Gln, Ser, Lys, Tyr, Gly, Asp, Thr. Das Cluster ist jedoch nicht so homogen korreliert wie Cluster 1. Die stärksten Korrelationen innerhalb des Cluster 2 bestehen zwischen den Gruppen His, Arg, Gln, Ser und der Gruppe Gln, Ser, Lys und Tyr sowie zwischen Gly, Asp und Thr. Cluster 1 und 2 zeigen generell einen antikorrelativen Trend, der jedoch für Lys und Thr weitestgehend nicht besteht. Zudem verhalten sich Pro, Glu und Asn weitestgehend unabhängig von Gln, Lys, Tyr und Ser, wobei bei letzterem eine Antikorrelation gegenüber Glu und Asn wieder ansteigt. Bezüglich der zwei anderen aromatischen Aminosäuren ergibt sich insbesondere für Phe keine signifikante Korrelation ($p < 0.01$). Trp zeigt eine positive Korrelation gegenüber

Ile, Leu, Ala und Val sowie eine negative zu His, Arg, Gln, Ser, Lys und Tyr. Abbildung 47b verdeutlicht die zuvor beschriebenen Korrelationen innerhalb der beiden Hauptkorrelationscluster noch spezifischer.

Aminosäureverteilungsprofile von PPP-Mutanten in SM-Ethanol

Das Aminosäureverteilungsprofil der Mutante $\Delta tk11$ ist nicht in der nachfolgenden Analyse enthalten, da für diese Mutante nur ein Replikat der ursprünglich quantifizierten Quadruplikate auswertbar war.

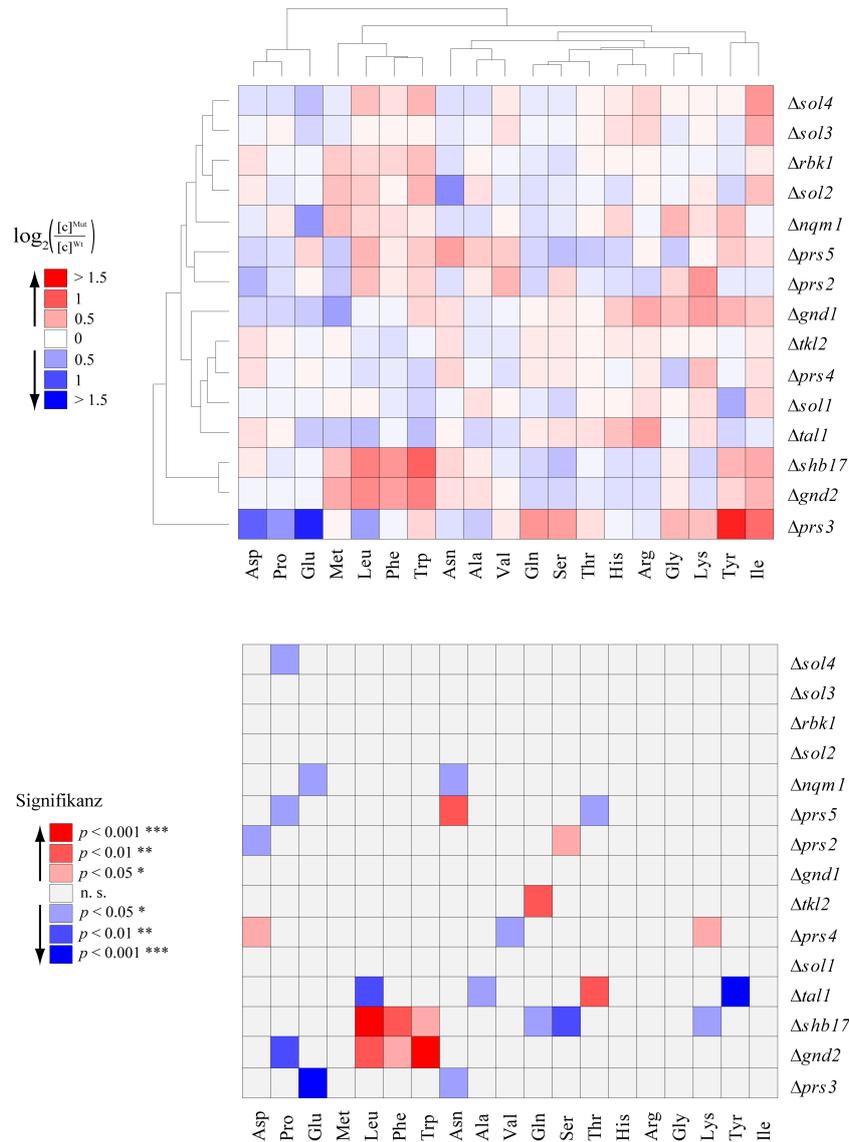


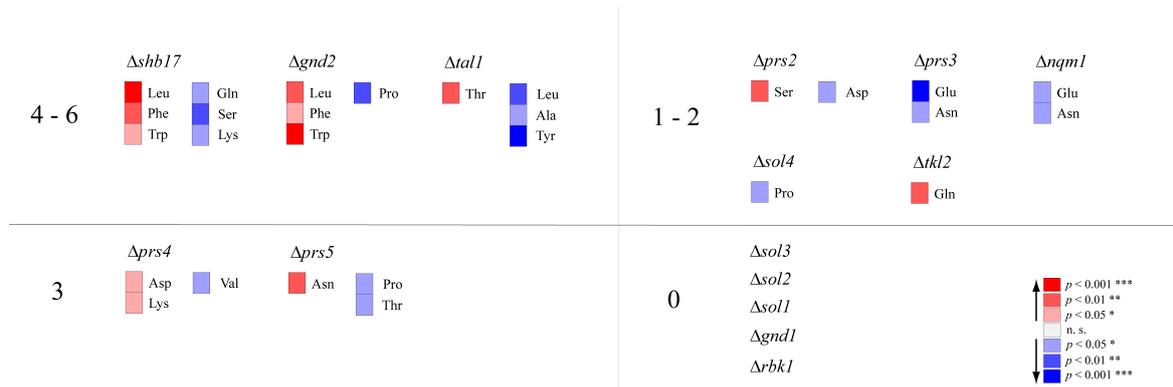
Abbildung 48: Aminosäureverteilungsprofil von PPP-Mutanten in SM-Ethanol. Aminosäureverteilungsprofil von 15 PPP-Mutanten. Obere Heatmap: Die relativen Konzentrationen (als \log_2 (Ratio Mutante/Wildtyp)) sind als Heatmap dargestellt, wobei das Wildtyplevel (weiß), erhöhte Konzentrationen (rot), verringerte Konzentrationen (blau) farblich gekennzeichnet sind. Untere Heatmap: Die Signifikanzintervalle nach Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***) verdeutlichen die signifikant vom Wildtyp abweichenden Konzentrationen. $n=4$; Leu (Leucin), Tyr (Tyrosin), Trp (Tryptophan), Phe (Phenylalanin), Ile (Isoleucin), Val (Valin), Met (Methionin), Arg (Arginin), Ala (Alanin), Lys (Lysin), Asp (Aspartat), Thr (Threonin), Gly (Glycin), Gln (Glutamin), Pro (Prolin), Ser (Serin), His (Histidin), Glu (Glutamin), Asn (Asparagin).

Die maximalen Veränderungen in der Konzentration betragen im Allgemeinen nicht mehr als 1-fach (\log_2) der Konzentration des Wildtyps (Abbildung 48). Nur die Mutante $\Delta prs3$ wies Konzentrationsveränderungen bis +1.3-fach (\log_2) für Tyrosin und -1.3-fach (\log_2) für Glutamat auf. Der Großteil der beobachteten veränderten

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

Aminosäurekonzentrationen unterschied sich nicht signifikant vom Wildtyp. Es traten generell nur sehr wenige Veränderungen in Erscheinung. Abbildung 49 fasst die Anzahl und Art der signifikanten Änderungen, ausgehend von Abbildung 48, spezifisch für jede Deletionsmutante übersichtlich zusammen.

a) Übersicht der signifikanten Änderungen in der jeweiligen Deletionsmutante



b) prozentuale Verteilung der veränderten Aminosäuren in den Deletionsmutanten

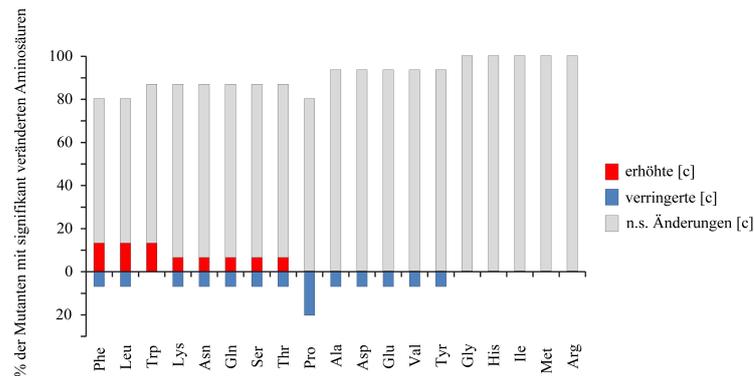


Abbildung 49: Signifikant veränderte Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Ethanol. a) Die Mutanten wurden entsprechend der Anzahl ihrer signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen gruppiert und die spezifisch veränderten Konzentrationen wurden, relativ zum Wildtyp, farblich gekennzeichnet. Wildtyp (weiß), Signifikant erhöhte Konzentrationen (rot), Signifikant verringerte Konzentrationen (blau). b) Prozentuale Verteilung der signifikant veränderten Aminosäuren über alle Mutanten. Student's t-Test ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***).

Aus Abbildung 49a wird die hierarchische Abfolge der Deletionsmutanten entsprechend ihrer Anzahl an signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen deutlich. Die Mutanten zeigten im Allgemeinen nur sehr wenige Änderungen, sodass maximal sechs Aminosäuren signifikant in ihrer Konzentration verändert waren. So zeigte die Mutante $\Delta shb17$ (6) unter dem Einfluss von Ethanol die meisten in ihrer Konzen-

tration veränderten Aminosäuren. Es folgen die Mutanten, bei denen weniger als $\frac{1}{4}$ der 19 untersuchten Aminosäuren in ihrer Konzentration verändert waren, d.h. es traten maximal 1-4 signifikant veränderte Aminosäuren auf. Diese Gruppe umfasst die Mutanten $\Delta gnd1$ (4), $\Delta tal1$ (4), $\Delta prs4$ (3), $\Delta prs5$ (3). Es folgt die Gruppe mit maximal 1-2 Änderungen bestehend aus $\Delta prs2$ (2), $\Delta prs3$ (2), $\Delta nqm1$ (2), $\Delta sol4$ (1), $\Delta tkl2$ (1). Die Mutanten $\Delta sol3$, $\Delta sol2$, $\Delta sol1$, $\Delta gnd1$, $\Delta rbk1$ wiesen keine signifikant veränderten Aminosäurekonzentrationen auf.

In Abbildung 49b wird erkennbar, welche Aminosäuren prozentual über alle Mutanten betrachtet am häufigsten von Konzentrationsänderungen betroffen waren. So zeigten jeweils 13% der Mutanten erhöhte Konzentrationen von Phenylalanin, Leucin und Tryptophan sowie 7% der Mutanten von Lysin, Asparagin, Glutamin, Serin und Threonin. Die am häufigsten von negativen Änderungen (verringerte Konzentrationen) betroffenen Aminosäuren in den Mutanten waren Prolin bei 20% der Mutanten sowie Phenylalanin, Leucin, Lysin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Alanin, Aspartat, Glutamat, Valin und Tyrosin bei jeweils 7% der Mutanten. Daraus ergibt sich, dass die Mutanten insgesamt am häufigsten von Konzentrationsänderungen der Aminosäuren Phenylalanin, Leucin und Prolin betroffen waren.

Nach Gruppierung der Aminosäuren entsprechend ihres metabolischen Vorläufers (vgl. Abbildung 34) ergeben sich folgende Beobachtungen:

Die Mutante, welche generell die häufigsten Änderungen aufwies ($\Delta shb17$), zeigte dabei speziell für die zwei aromatischen Aminosäuren Phe und Trp (aus PEP+E4P) und für Leu (aus Pyr) erhöhte Konzentrationen. Homolog dazu waren die betroffenen Aminosäuren der Mutante $\Delta gnd2$. Verringerte Konzentrationen traten für Gln, Ser und Lys (aus α -KG, 3-PG, OxAc) auf. Die Mutante $\Delta gnd2$ zeigte ebenfalls für einen Vertreter des α -KG - Clusters (Pro) verringerte Konzentrationen.

Funktionelle paarweise Korrelationsanalyse der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Ethanol

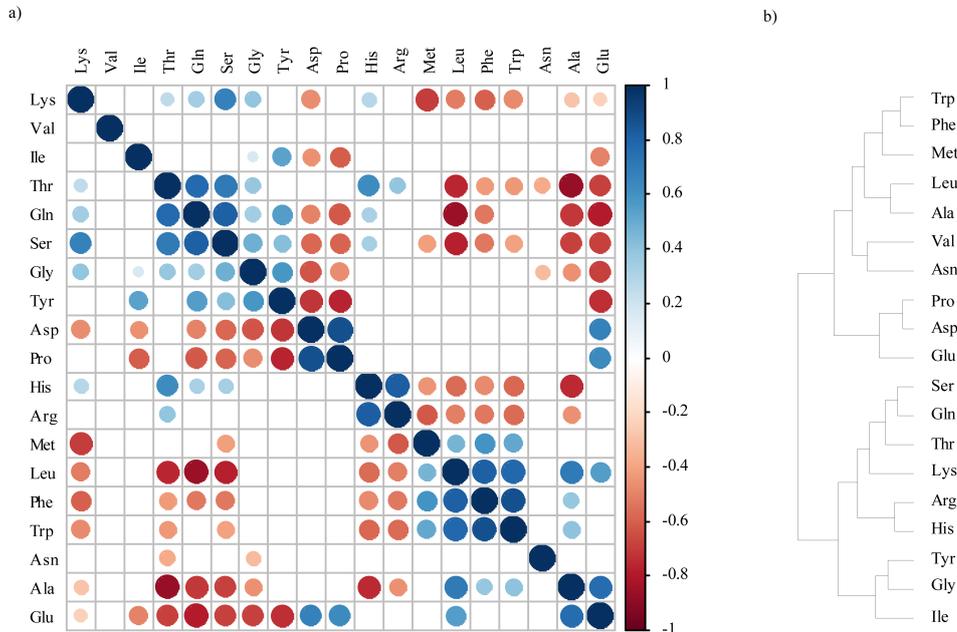


Abbildung 50: Pearsonkorrelationsdiagramm-/dendrogramm der Aminosäuren von PPP-Mutanten in SM-Ethanol. a) Die paarweisen Korrelationswerte (Signifikanzschränke $p < 0.01$) von 19 Aminosäuren über 15 PPP-Mutanten nach Pearson. Negative Korrelation (rot), Positive Korrelation (blau). b) Das resultierende Korrelationsdendrogramm auf Basis der Korrelationswerte nach Pearson.

Für die PPP-Mutanten ergeben sich aus Abbildung 50a/b diverse Subgruppen bezüglich der Aminosäurekorrelationen. Allgemein treten die stärksten positiven Korrelationen zwischen Thr, Gln, Ser (Gruppe 1), Asp und Prolin (Gruppe 2), His und Arg (Gruppe 3), Leu, Phe und Trp (Gruppe 4) sowie Ala und Glu (Gruppe 5) auf. Diese eben genannten Gruppen zeigen nun mehr oder weniger starke Antikorrelation zu den übrigen Gruppen, wobei sie teilweise nur gegen spezifische Gruppen antikorrelieren. So zeigt sich bspw. zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2/4/5 eine Antikorrelation. Gruppe 2 antikorreliert vorwiegend nur gegen Gruppe 1 und zusätzlich gegen Gly und Tyr. Gruppe 3 antikorreliert hauptsächlich gegen Gruppe 4 sowie gegenüber Met und Ala, Gruppe 4 umgekehrt vorwiegend gegen Gruppe 3 und zusätzlich gegen Gruppe 1 sowie gegen Lys. Gruppe 5 zeigt ebenfalls hauptsächlich spezifische Antikorrelation zu Gruppe 1 und zusätzlich zu Gly und Tyr, wobei dies vor allem für Glu gilt.

4.3.3 Zusammenfassung der Aminosäureverteilungsprofile

Nach der Einzelanalyse der verschiedenen Deletionsmutanten aus den beiden Stoffwechselwegen Glycolyse und PPP sollen in diesem Abschnitt die Ergebnisse noch einmal vergleichend zusammengefasst werden. Der Fokus liegt dabei u.a. in einem generellen Vergleich der Effekte, welche die drei Kohlenstoffquellen auf die Aminosäureverteilung der Mutanten haben. Eine weitere zu klärende Frage ist, ob es zwischen den veränderten Aminosäurekonzentrationen spezifisch für jede Mutante Gemeinsamkeiten bezüglich der Konstanz der Änderungen im Vergleich von Glucose, Galactose, Ethanol gibt. Dadurch können u.a. Mutanten unterschieden werden, welche entweder spezifisch für eine gegebene Kohlenstoffquelle Veränderungen des Aminosäurepools aufweisen oder gegensätzlich dazu über mehrere bzw. alle Kohlenstoffquellen eine hohe Konstanz bezüglich der Veränderungen zeigen und damit eine potentiell regulatorische Position bezüglich des Aminosäurespiegels einnehmen. Weiterhin kann man über alle Mutanten der Glycolyse bzw. des PPP betrachtet, analysieren, wie sich die Konzentrationen der Aminosäuren unter Glucose, Galactose, Ethanol im Trend verändern und zusätzlich Aussagen über den Trend dieser Cluster treffen. Abschließend soll anhand der vorangegangenen Korrelationsanalysen die Konstanz bzw. Variabilität der bestehenden Aminosäurekorrelationen vergleichend zwischen Glucose, Galactose und Ethanol aufgezeigt werden.

4.3.3.1 Vergleich der Aminosäureprofile unter Glucose, Galactose, Ethanol.

Um den generellen Einfluss der Zuckersubstrate auf die Aminosäureverteilung zu verdeutlichen und die heterogene Verteilung der Aminosäuren bei den verschiedenen Zuckersubstraten zu kompensieren, wurden alle Konzentrationen der jeweiligen Aminosäuren zuvor auf einen Mittelwert von 0 und eine Varianz von 1 standardisiert (Z-Transformation). Die resultierenden Werte bilden dadurch ein Vielfaches der Standardabweichung vom Mittelwert aller gemessenen Konzentrationen ab. Die Ergebnisse der Z-Transformation sind in Abbildung 51 dargestellt.

4.3 Genetische-/Umweltbedingte Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels

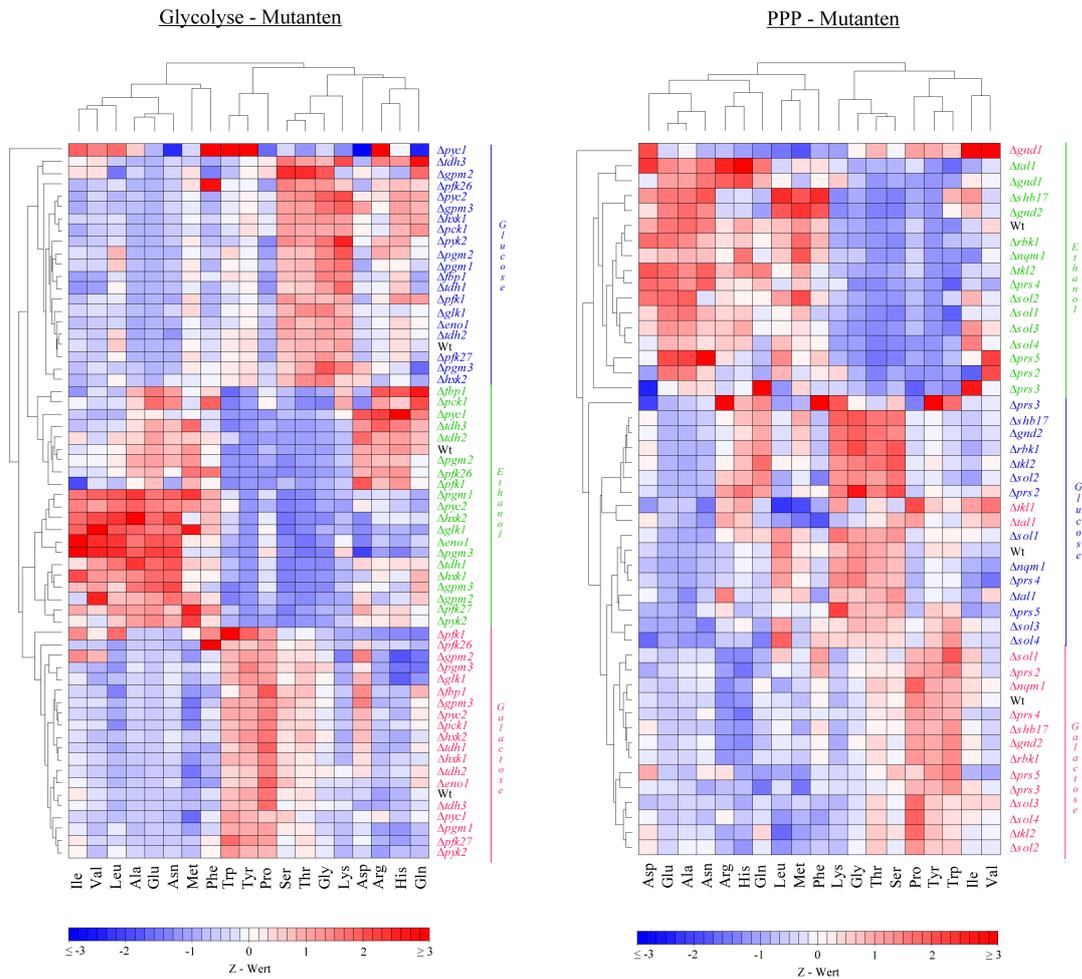


Abbildung 51: Z-Transformation der Aminosäurekonzentrationen unter Glucose, Galactose, Ethanol. Die standardisierte Aminosäurekonzentration von Glycolyse-/ PPP-Mutanten unter dem Einfluss von Glucose, Galactose, Ethanol. Die Konzentrationen aller Aminosäuren über alle Mutanten wurden auf einen Mittelwert von 0 und eine Varianz von 1 standardisiert. Die Mutanten wurden nach der zugrundeliegenden Kohlenstoffquelle farblich unterschieden: Mutanten in SM-Glucose (blau), Mutanten in SM-Galactose (rot), Mutanten in SM-Ethanol (grün), Wildtyp (schwarz).

Aus den Z-Transformationen lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen: für die Mutanten der Glycolyse (Abbildung 51, Bild links) zeigt sich, dass es zu einer deutlichen Ausbildung von größeren Gruppen kommt, wobei sich die Mutanten spezifisch nach ihrer zugrundeliegenden Kohlenstoffquelle gruppieren. Dabei fällt auf, dass jedes Zuckersubstrat zu einem charakteristischen Aminosäureverteilungsprofil führt. Zwischen Glucose und Galactose besteht ein zueinander ähnlicheres Gesamtprofil als gegenüber Ethanol. Für Glucose sind dabei besonders die durchschnittlich erhöhten Konzentrationen von Ser, Thr, Gly und Lys auffällig. Daneben finden sich für die übrigen Aminosäuren Konzentrationsverteilungen, welche nahe bzw.

leicht verringert zum Mittelwert aller Substrate und Mutanten sind. Für Galactose findet sich ein prinzipiell analoges Profil, jedoch sind dabei die Aminosäuren Trp, Tyr und Pro im Vergleich zum Durchschnitt in ihrer Konzentration erhöht. Unter Ethanol tritt besonders für die eben genannten Aminosäuren Trp, Tyr, Pro, Ser, Thr, Gly und Lys ein inverser Konzentrationstrend auf. Die Aminosäuren zeigen im Vergleich zu Glucose und Galactose verringerte Konzentrationen. Des Weiteren fällt unter Ethanol besonders die in ihrer Konzentration erhöhte Subgruppe der Aminosäuren Ile, Val, Leu, Ala, Glu, Asn auf, welche nur bei einzelnen Mutanten unter Ethanol erhöht ist (besonders stark für $\Delta pgm1$, $\Delta pyc2$, $\Delta h\alpha k2$, $\Delta glk1$, $\Delta eno1$, $\Delta pgm3$). Dieses Cluster weicht zudem noch stärker vom Wildtyp (unter Ethanol) ab. Unter Glucose und Galactose zeigt der Wildtyp weitestgehend ähnliche Profile zu den Mutanten auf dem jeweiligen Zuckersubstrat.

Für die Mutanten des PPP (Abbildung 51, Bild rechts) ergeben sich prinzipiell vergleichbare Aussagen, jedoch sind die Unterschiede zwischen den Profilen von Glucose und Galactose etwas stärker. Unter Glucose zeigen sich im Vergleich zum Durchschnitt erneut, wie schon für die Glycolysemutanten, erhöhte Konzentrationen von Ser, Thr, Gly und Lys. Gleiches tritt erneut unter Galactose für die Aminosäuren Trp, Tyr und Pro auf. Eine kleine Gruppe von Mutanten unter Glucose weist zudem leicht erhöhte Konzentrationen von His und Gln auf. In dem Zusammenhang fällt auf, dass sich die Galactoseprofile von $\Delta tkl1$ und $\Delta tal1$ zwischen die Glucoseprofile clustern. Unter Ethanol ist ebenfalls die inverse Konzentrationsverteilung zu Glucose und Galactose, wie schon bei den Glycolysemutanten, sichtbar. Besonders verringerte Konzentrationen betreffen dabei diejenigen Aminosäuren, welche unter Glucose und Galactose erhöht waren. Die am stärksten erhöhten Konzentrationen unter Ethanol betreffen erneut die Aminosäuren Ala, Asn, und Glu. Des Weiteren finden sich ebenfalls tendenziell höhere Konzentrationen von His, Gln, Arg, Leu und Met. Das Galactoseprofil der Mutante $\Delta gnd1$ clustert zudem mit den Ethanolprofilen, wobei das Profil dieser Mutante insgesamt am meisten von allen anderen Mutanten abweicht. Für die Profile der PPP-Mutanten ergeben sich insgesamt höhere Ähnlichkeiten zu den Wildtypen innerhalb ihrer zugrundeliegenden Zuckersubstrate.

4.3.3.2 Übergreifende Effekte von Glycolyse-/ PPP-Mutanten zwischen Glucose, Galactose und Ethanol.

Es soll aufgezeigt werden, ob es Gemeinsamkeiten bezüglich der Wirkung von Stoffwechselfeletionen zwischen den verschiedenen Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose und Ethanol gibt. D.h. gibt es konstante Änderungen, welche sich bei zwei (Glucose/Galactose, Glucose/Ethanol, Galactose/Ethanol) oder bei allen drei Kohlenstoffquellen beobachten lassen.

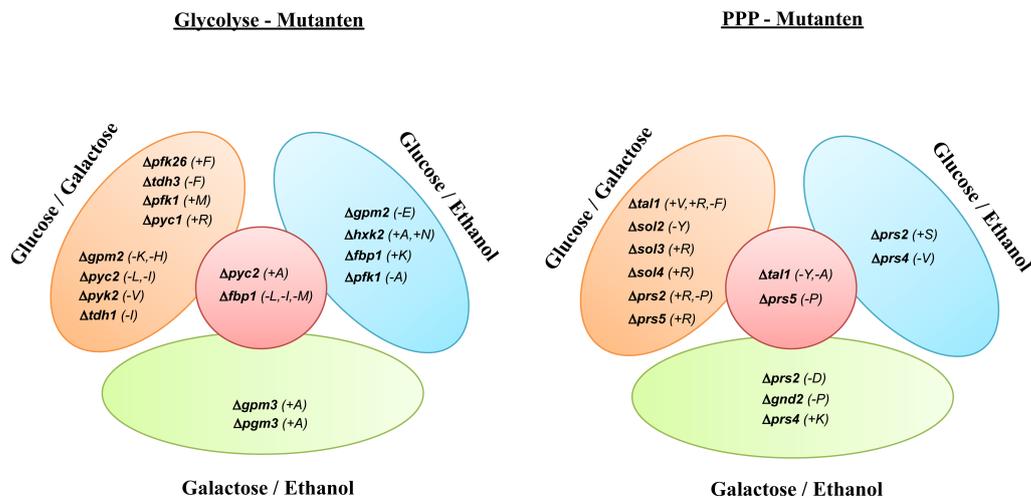


Abbildung 52: Übergreifende Effekte von Stoffwechselfeletionen zwischen Glucose, Galactose, Ethanol. Gemeinsamkeiten in der Wirkung der Mutanten hinsichtlich der betroffenen Aminosäuren zwischen den drei Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose, Ethanol sind jeweils separat für die Glycolyse-/ PPP-Mutanten dargestellt. Die Überschneidungen der Effekte der Mutanten sind durch farbliche Kreise für die jeweiligen Kohlenstoffquellen dargestellt und zusätzlich sind die betroffenen Aminosäuren in Klammern und die Richtung der Veränderungen durch die Vorzeichen +/- (erhöhte Konzentrationen (+), verringerte Konzentrationen (-)) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp abgebildet. Gemeinsamkeiten zwischen Glucose/Galactose (orange); Glucose/Ethanol (blau); Galactose/Ethanol (grün); Glucose/Galactose/Ethanol (rot). Die Aminosäuren wurden als Einbuchstabencode angegeben: Phenylalanin (F); Methionin (M); Arginin (R); Lysin (K); Histidin (H); Leucin (L); Isoleucin (I); Valin (V); Alanin (A); Glutamat (E); Asparagin (N); Tyrosin (Y); Prolin (P); Aspartat (D); Serin (S).

Sowohl für die Glycolyse- als auch für die PPP-Mutanten fanden sich jeweils nur zwei Mutanten, welche konstant veränderte Aminosäurekonzentrationen unter den drei Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose, Ethanol aufwiesen (Abbildung 52). Das traf für die Glycolysemutanten $\Delta pyc2$ und $\Delta fbp1$ und für die PPP-Mutanten $\Delta tal1$ und $\Delta prs5$ zu. Daneben fanden sich ebenfalls im Vergleich zwischen Glycolyse und PPP die häufigsten Gemeinsamkeiten der Mutanten zwischen Glucose und Galactose. Die wenigsten Mutanten zeigten generell konstante Änderungen unter Glucose und Ethanol. Insgesamt waren die aufgeführten Mutanten der Glycolyse am häufigsten von Konzentrationsänderungen der Aminosäuren Alanin betroffen,

gefolgt von Isoleucin und Methionin. Die PPP-Mutanten, wobei generell die häufigsten Überschneidungen der Kohlenstoffquellen bei den Mutanten $\Delta tal1$ und den Δprs - Mutanten gefunden wurden, zeigten besonders für Arginin die meisten Änderungen, gefolgt von Prolin und Tyrosin. Abschließend muss angemerkt werden, dass alle Mutanten die nicht in der Abbildung angegeben sind, nur spezifische Änderungen für die jeweiligen Kohlenstoffquellen zeigten. Das betraf die Glycolysemutanten $\Delta glk1$, $\Delta pgm1$, $\Delta pgm2$, $\Delta eno1$, $\Delta pck1$, $\Delta hck1$, $\Delta tdh2$ und $\Delta pfk27$ sowie die PPP-Mutanten $\Delta prs3$, $\Delta rbk1$, $\Delta shb17$, $\Delta sol1$, $\Delta nqm1$ und $\Delta tkk2$. Die spezifischen Änderungen wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln separat für jede Kohlenstoffquelle besprochen (vgl. Abschnitt 4.3.2). Es lässt sich demnach zusammenfassend feststellen, dass die meisten der durch Deletionen von Stoffwech-selenzymen hervorgerufenen Aminosäureänderungen zumeist spezifisch bei einer der drei untersuchten Kohlenstoffquellen auftraten.

4.3.3.3 Konzentrationstrend der Aminosäuren unter Glucose/Galactose/Ethanol.

Um darzustellen, welche Aminosäuren unter dem Einfluss der verschiedenen Kohlenstoffquellen generell stabil bzw. variabel in ihrer durchschnittlichen Konzentration waren, wurden die Aminosäuren entsprechend ihres gemeinsamen metabolischen Vorläufers (vgl. Abschnitt 4.3.2 Abbildung 34) gruppiert und dabei, innerhalb der Gruppe, bezüglich der drei Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose, Ethanol verglichen. Dazu wurden jeweils die relativen Konzentrationswerte aufgetragen, deren arithmetisches Mittel bestimmt und nachfolgend eine Trendlinie für das gesamte Vorläufercluster, ausgehend von der individuellen Mittelwerten, eingefügt. Daran kann abgelesen werden, welche Vorläufercluster und welche individuellen Aminosäuren unter den drei Kohlenstoffquellen die höchste Konstanz bzw. die größte Variabilität aufwiesen.

Konzentrationstrends der Aminosäuren von Glycolysemutanten

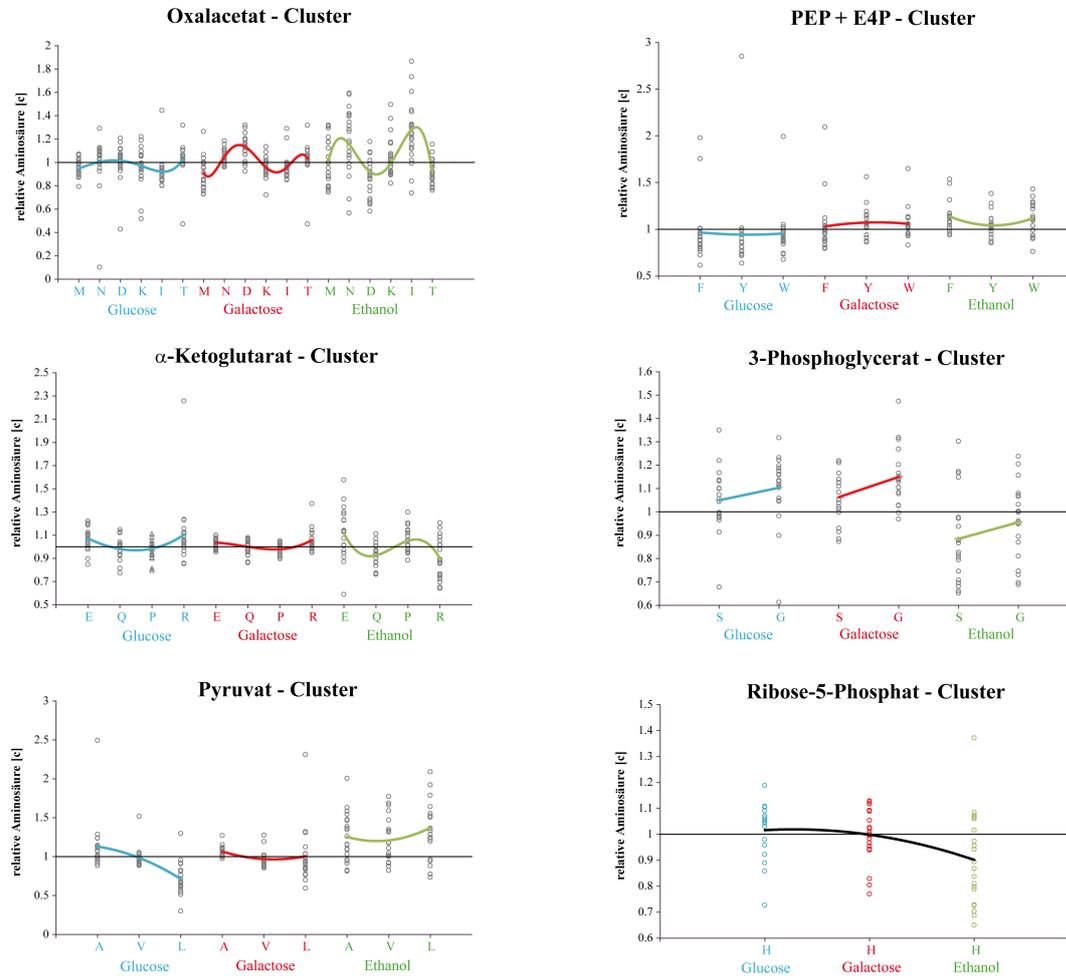


Abbildung 53: Konzentrationstrend der Aminosäuren von Glycolysemutanten. Die Aminosäuren wurden nach ihren metabolischen Vorläufern gruppiert und die relativen Konzentrationen (Ratio Mutante/Wildtyp) aller Mutanten aufgetragen. Ausgehend vom Mittelwert der Konzentrationen in allen Mutanten wurde eine Trendlinie eingefügt, um den Trend der Konzentrationen unter Glucose/ Galactose/ Ethanol zu vergleichen. Die schwarze Linie bei $y = 1$ zeigt das Wildtyplevel an. Methionin (M), Asparagin (N), Aspartat (D), Lysin (K), Isoleucin (I), Threonin (T), Glutamat (E), Glutamin (Q), Prolin (P), Arginin (R), Alanin (A), Valin (V), Leucin (L), Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W), Serin (S), Glycin (G), Histidin (H), Phosphoenolpyruvat (PEP), Erythrose-4-phosphat (E4P).

Für die Aminosäuren aus dem Oxalacetatcluster lassen sich folgende Aussagen aus Abbildung 53 entnehmen: Methionin, Lysin und Threonin zeigten die stabilsten Konzentrationen unter allen drei Kohlenstoffquellen. Asparagin und Isoleucin waren besonders im Vergleich zu Glucose (Glc) spezifisch unter Ethanol (EtOH) in ihrer Konzentration erhöht (18% bei Asn, 33% bei Ile) und zeigten ansonsten unter

Glucose und Galactose (Gal) ähnliche Konzentrationsverhältnisse. Aspartat ist die Aminosäure mit der höchsten Variabilität, wobei die höchsten Konzentrationen unter Galactose (14% Anstieg zu Glc) und die geringsten unter Ethanol (15% weniger als Glc) auftraten. Gruppirt man alle Aminosäuren des Clusters zusammen, so ergibt sich im Durchschnitt für das Oxalacetatcluster ein leicht ansteigender Konzentrationstrend unter Ethanol. Für das α -Ketoglutarat - Cluster ergaben sich bei Glutamat und Prolin die stabilsten Konzentrationen. Glutamin und Arginin zeigten unter Glucose und Galactose individuell ähnliche Konzentrationsverhältnisse. Unter Ethanol fielen diese jedoch bei beiden ab. Im Durchschnitt aller Aminosäuren des Clusters ergab sich eine relativ homogene Verteilung der Konzentrationen über alle Kohlenstoffquellen, wobei die Konzentrationen unter Glucose und Galactose leicht über denen unter Ethanol lagen. Das Pyruvatcluster zeigte sich insgesamt sehr variabel. Bei Alanin waren die Konzentrationen insgesamt alle über dem Wildtyplevel, jedoch war der Unterschied zwischen Glucose und Galactose minimal (6%). Die höchsten Konzentrationen traten unter Ethanol auf (19% Anstieg zu Gal). Bei Valin zeigte sich ein analoges Bild zu Alanin mit ebenfalls den höchsten Werten unter Ethanol (23% Anstieg zu Glc/Gal). Leucin wies die größte Variabilität bezüglich seiner Konzentrationsverhältnisse unter den drei Substraten auf. Im Vergleich zu Galactose, wo durchschnittlich Wildtypkonzentrationen erreicht wurden, waren die Konzentrationen unter Glucose um 29% niedriger und unter Ethanol um 36% höher. Somit ergab sich ein Unterschied von 66% zwischen Glucose und Ethanol. Allein durch Leucin zeichnet sich der Trend des gesamten Clusters zu erhöhten Konzentrationen unter Ethanol deutlich ab. Das Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat - Cluster zeigte die höchste Konstanz unter allen Vorläuferclustern. Die Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan waren durchschnittlich unter allen drei Kohlenstoffquellen relativ vergleichbar mit dem Wildtyplevel. Tendenziell waren die Level unter Galactose und Ethanol, im Vergleich zu Glucose, jedoch minimal erhöht ($\sim 5\%$ zwischen Glc/Gal und max. 15% zwischen Glc und EtOH). Für das 3-Phosphoglycerat - Cluster ergaben sich erhöhte Konzentrationen von Serin und Glycin unter Glucose und Galactose (6-14% über Wildtyplevel), während unter Ethanol die Konzentrationen tendenziell 5-10% unter dem Wildtyplevel und damit im Vergleich zu Glucose und Galactose um 17% verringert vorlagen. Für Histidin, dem einzigen Vertreter der aus Ribose-5-phosphat hervorgehenden Aminosäuren, zeigten sich tendenziell unter Glucose und Galactose

zum Wildtyp vergleichbare Konzentrationen. Nur unter Ethanol traten durchschnittlich um 10% verringerte Konzentrationen auf.

Konzentrationstrends der Aminosäuren von PPP-Mutanten

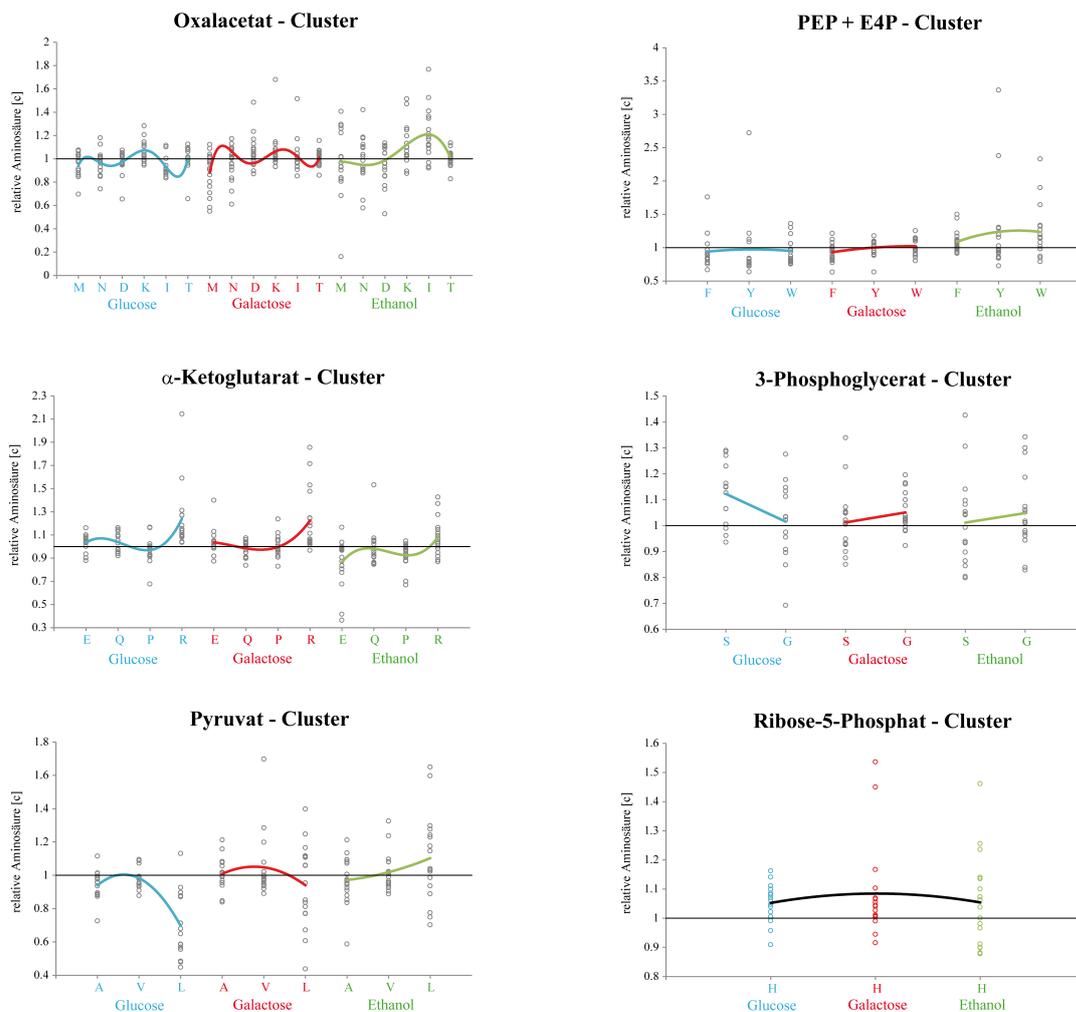


Abbildung 54: Konzentrationstrend der Aminosäuren von PPP-Mutanten. Die Aminosäuren wurden nach ihren metabolischen Vorläufern gruppiert und die relativen Konzentrationen (Ratio Mutante/Wildtyp) aller Mutanten aufgetragen. Ausgehend vom Mittelwert der Konzentrationen in allen Mutanten wurde eine Trendlinie eingefügt, um den Trend der Konzentrationen unter Glucose/Galactose/Ethanol zu vergleichen. Die schwarze Linie bei $y = 1$ zeigt das Wildtyplevel an. Methionin (M), Asparagin (N), Aspartat (D), Lysin (K), Isoleucin (I), Threonin (T), Glutamat (E), Glutamin (Q), Prolin (P), Arginin (R), Alanin (A), Valin (V), Leucin (L), Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W), Serin (S), Glycin (G), Histidin (H), Phosphoenolpyruvat (PEP), Erythrose-4-phosphat (E4P).

Für die Aminosäuren aus dem Oxalacetatcluster lassen sich folgende Aussagen aus Abbildung 54 entnehmen: Asparagin, Lysin und Threonin zeigten die stabilsten

Konzentrationen (Abweichungen max. 5%) unter allen drei Kohlenstoffquellen. Aspartat zeigte unter Glucose und Ethanol vergleichbare Konzentrationen (5% unter Wildtyplevel). Für Galactose ergaben sich, im Vergleich zum Wildtyp, um 5% erhöhte Konzentrationen, sodass die Abweichung zwischen den drei Substraten bei max. 10% lag. Bei Methionin und Isoleucin ergab sich für die PPP-Mutanten die größte Variabilität. Methionin zeigte die niedrigsten Konzentrationen unter Galactose (13% unter Wildtyplevel), gefolgt von Glucose (6% unter Wt). Daraus ergab sich mit 16% die größte Abweichung zwischen Galactose und Ethanol. Bei Isoleucin waren die Konzentrationen unter Glucose gegenüber dem Wildtyp um 8% verringert und unter Ethanol um 20% erhöht, sodass die größte Diskrepanz zwischen Glucose und Ethanol auftrat (29%). Insgesamt ergaben sich dadurch für das gesamte Oxalacetatcluster ansteigende Konzentrationen von Glucose nach Ethanol. Für das *alpha*-Ketoglutarat - Cluster ergaben sich bei Glutamin und Prolin die stabilsten Konzentrationen. Glutamat und Arginin zeigten beide unter Glucose und Galactose erhöhte und zudem konstante Konzentrationen, jedoch waren die Konzentrationen bei Arginin durchschnittlich stärker erhöht (24% über Wt-Level). Die beiden Aminosäuren zeigten ebenfalls die geringsten Konzentrationen unter Ethanol (für Glu 11% unter Wt, für Arg 6% über Wt). Somit ergaben sich insgesamt Unterschiede von 14% von Glucose/Galactose zu Ethanol bei Glutamat und 18% bei Arginin. Der Konzentrationstrend des gesamten Clusters war demnach von Glucose nach Ethanol tendenziell abfallend. Das Pyruvatcluster zeigte erneut, besonders für Leucin, die größte Variabilität unter den Kohlenstoffquellen, bei ansonsten hoher Konstanz von Alanin und Valin. Die mittleren Konzentrationen von Leucin unter Ethanol waren im Vergleich zum Wildtyp um 30% verringert, bei Galactose um 8% verringert und unter Ethanol um 13% erhöht, sodass der Unterschied zwischen Glucose und Ethanol erneut am stärksten (43%) ist. Das gesamte Cluster wies demnach einen prinzipiell in seiner Konzentrationsverteilung ansteigenden Trend von Glucose nach Ethanol auf. Für das Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat - Cluster zeigte sich die höchste Konstanz bei den drei aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) unter Glucose und Galactose (max. 5% Abweichung zum WT-Level). Alle Aminosäuren des Clusters zeigten unter Ethanol die höchsten mittleren Konzentrationen, wobei sich für Tryptophan (17% über Wt-Level) die höchste Steigerung zwischen Glucose/Galactose und Ethanol ergab (21%, gefolgt von Phe mit 15% und Tyr mit 14%). Der Trend des Clusters war

dadurch erwartungsgemäß ebenfalls ansteigend. Für das 3-Phosphoglycerat - Cluster ergab sich bei Glycin eine hohe Konstanz der Konzentrationen zwischen allen drei Substraten. Serin zeigte nur unter Glucose um 12% erhöhte Konzentrationen und ansonsten für Galactose und Ethanol nahezu Wildtyp-ähnliche Verhältnisse. Der Trend des Clusters war leicht abfallend von Glucose zu Ethanol, aber dennoch minimal über dem Wildtyplevel. Für Histidin, dem einzigen Vertreter der aus Ribose-5-phosphat hervorgehenden Aminosäuren, zeigte sich grundlegend eine hohe Konstanz der Konzentrationen unter den drei Substraten. Zum Wildtyp ergaben sich maximale Abweichungen von 8% bei Galactose.

4.3.3.4 Dynamik der Aminosäurekorrelationen unter Glucose/Galactose/Ethanol

Um die Dynamik der Aminosäurekorrelationsgruppen für sowohl Glycolyse-/ PPP-Mutanten bezüglich der Kohlenstoffquellen (Glucose/ Galactose/ Ethanol) darzustellen, wurde ein Tanglegram erstellt. Dadurch kann bestimmt werden, welche Aminosäurekorrelationen unter den verschiedenen Substraten konstant bestehen bleiben bzw. welche Korrelationen sich auflösen.

4 Ergebnisse

Glycolyse - Deletionen

Pentosephosphatweg - Deletionen

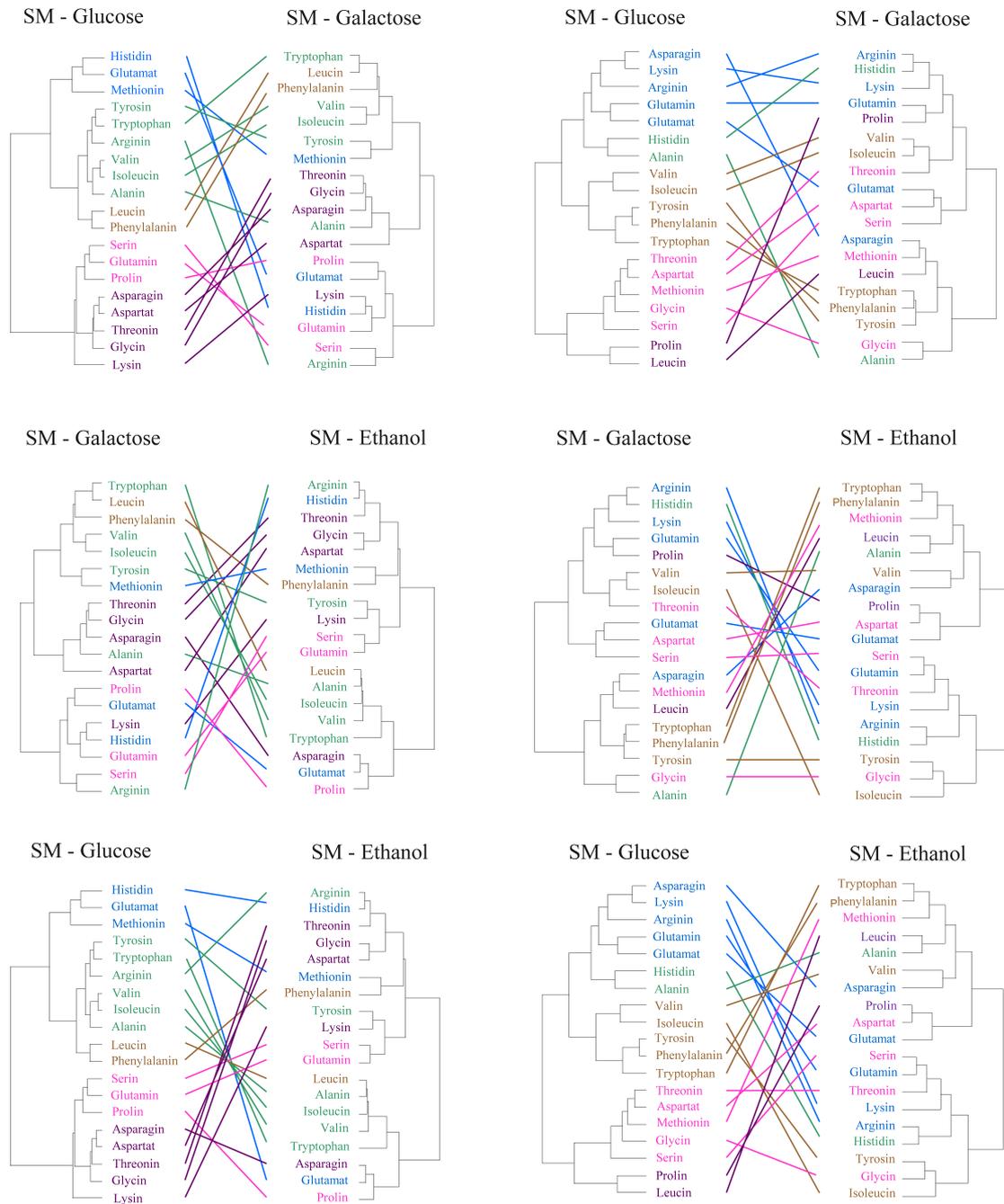


Abbildung 55: Tanglegram zum Analyse der Dynamik der Aminosäurekorrelationscluster. Die Korrelationsdendrogramme ausgehend von der Pearsonkorrelation über alle Mutanten aus Glycolyse bzw. PPP unter Glucose, Galactose, Ethanol sind dargestellt. Die Farben codieren die Cluster unter Glucose. Die Farbcodierung wird beibehalten um die Dynamik der Aminosäuren zu demonstrieren.

Für die Glycolysemutanten lassen sich aus Abbildung 55 folgende Aussagen extrahieren: im Vergleich zwischen Glucose und Galactose zeigte sich, dass sich das Korrelationscluster 1 (His, Glu, Met) unter Galactose auflöst. Methionin zeigte dabei weiter Ähnlichkeit zu Cluster 2 (Tyr, Trp, Arg, Val, Ile, Ala) wie schon bei Glucose. Einzig Glutamat und Histidin gruppierten sich unter Galactose mehr in Richtung des ehemaligen Cluster 4 (Ser, Gln, Pro) unter Glucose. Für Cluster 2, Cluster 3 (Leu, Phe) sowie Cluster 5 (Asn, Thr, Gly, Asp) zeigte sich eine weitestgehend konstante Korrelation auch unter Galactose. Bei Alanin zeigte sich unter Galactose eine höhere Ähnlichkeit zum ehemaligen Cluster 5. Arginin wechselte ebenfalls die Korrelationsgruppe und gruppierte sich unter Galactose nun zusammen mit dem ehemaligen Cluster 4 sowie Lysin und Glutamat. Im Vergleich zwischen Galactose und Ethanol wurden die ehemaligen Cluster, welche bei Glucose aufgetreten sind, teilweise noch weiter aufgelöst. Die höchste Konstanz verblieb jedoch weiterhin zwischen Threonin, Glycin und Aspartat (ehemals Cluster 5) sowie zwischen Serin, Glutamin (ehemals Cluster 4) und der Gruppe Alanin, Isoleucin Valin und Tryptophan (ehemals Cluster 2). Eine starke Separierung trat vor allem für Histidin, Glutamat und Methionin (ehemals Cluster 1) sowie für Leucin und Phenylalanin (ehemals Cluster 3) auf. Im Vergleich von Glucose und Ethanol zeigte sich, wie schon im Vergleich zwischen Galactose und Ethanol, dass zwischen Threonin, Glycin und Aspartat (ehemals Cluster 5) sowie zwischen Serin, Glutamin (ehemals Cluster 4) und der Gruppe Alanin, Isoleucin Valin und Tryptophan (ehemals Cluster 2) weiterhin eine relativ konstante Korrelation bestehen blieb. Ebenso verhielt es sich für die deutliche Separierung der ehemaligen Cluster 1 und 3.

Für die PPP-Mutanten lassen sich aus Abbildung 55 folgende Aussagen extrahieren: im Vergleich von Glucose und Galactose zeigte sich, dass das Korrelationscluster 1 (Asn, Lys, Arg, Gln, Glu) unter Galactose weiterhin eine hohe Ähnlichkeit aufwies. Speziell Arginin, Lysin, Glutamin zeigten dabei weiterhin hohe Korrelationen. Cluster 2 (His, Ala) wurde stark separiert. Das Cluster 3 (Val, Ile, Tyr, Trp, Phe) separierte sich zwar, zeigte aber weiterhin beständige Korrelationen zwischen Valin und Isoleucin sowie zwischen den aromatischen Aminosäuren. Aus Cluster 4 (Thr, Asp, Met, Gly, Ser) verblieb weiterhin eine hohe Korrelation zwischen Threonin, Aspartat und Serin. Cluster 5 (Pro, Leu) separierte analog zu Cluster 2 sehr stark. Im Vergleich von Galactose und Ethanol blieben bei einigen Aminosäuren die Korrelationen unter Galactose auch bei Ethanol weiter bestehen. Dies galt bspw.

für Lysin, Arginin und Glutamin sowie Asparagin und Glutamat (alle ehemals Cluster 1). Weiterhin näherten sich Prolin und Leucin wieder stärker an (ehemals Cluster 5). Die Korrelationen zwischen dem ehemaligen Cluster 3 (Val, Ile, Tyr, Trp, Phe) blieben ebenfalls bestehen, jedoch korrelierte Valin unter Ethanol mehr mit Phenylalanin und Tryptophan und Isoleucin mehr mit Tyrosin. Zu letzterem zeigte Glycin ebenfalls weiterhin eine hohe Korrelation. Die stärkste Separierung zeigten weiterhin Histidin und Alanin (ehemals Cluster 2). Im Vergleich von Glucose und Ethanol zeigte sich die Auflösung von Cluster 1 (Asn, Lys, Arg, Gln, Glu) bei verbleibender Korrelation zwischen Asparagin und Glutamat sowie zwischen Glutamin und besonders Lysin und Arginin. Histidin und Alanin separierten, wie schon bei Galactose, besonders stark. Für das Cluster 3 (Val, Ile, Tyr, Phe, Trp) verblieb weiterhin eine zwei zu drei Korrelation einerseits zwischen Isoleucin und Tyrosin, andererseits zwischen Tryptophan, Phenylalanin und Valin. Cluster 4 (Thr, Asp, Met, Gly, Ser) löste sich ebenfalls weitestgehend auf. Die stärkste Korrelation verblieb nur zwischen Serin und Threonin. Prolin und Leucin korrelierten unter Ethanol erneut stärker als unter Galactose.

5 Diskussion

In diesem Abschnitt werden die zuvor präsentierten Ergebnisse abschließend diskutiert. Dabei erfolgt wie zuvor eine Trennung der beiden experimentellen Bereiche. Zu Beginn des Kapitels werden die Ergebnisse des Haploprofizienzcreens sowie die daraus resultierende haploprofiziente Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ diskutiert. Weiterhin soll diskutiert werden, unter welchen Bedingungen sich genetische Interaktionen von *VHR1* und *NQM1* als vorteilhaft herausstellen und wie diese potentiellen regulativen Zusammenhänge im Kontext mit bisher etablierten Modellen zur Regulation des chronologischen Alterns bzw. der Langzeitadaptation unter sich verändernden Umweltbedingungen, speziell bei Nährstoffmangel, in Verbindung stehen.

Im zweiten Teil der Diskussion werden die Ergebnisse der Wachstums- und Aminosäureverteilungsprofile von Glycolyse-/PPP-Mutanten diskutiert. Dabei soll für ausgewählte Deletionsmutanten versucht werden die beobachteten Profile anhand der zugrundeliegenden Deletion bzw. der Position der deletierten Enzyme innerhalb des Stoffwechselweges zu erklären und dabei diejenigen Deletionsmutanten zu identifizieren, welche unter den gegebenen Umständen (variiere Kohlenstoffquellen) den größten Einfluss auf die Verteilung der intrazellulären Aminosäuren haben. Gleichzeitig soll aufgeklärt werden, ob und inwiefern die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen selbst, bereits ein charakteristisches Aminosäureverteilungsprofil ausprägen. Weiterhin soll diskutiert werden, welche Aminosäuren hauptsächlich von genetischen und Umweltperturbationen betroffen sind und wie sich deren Konzentrationsverteilungen zwischen Glucose, Galactose und Ethanol unterscheiden. Abschließend soll die Frage geklärt werden, ob sich prinzipiell Korrelationen bestimmter Aminosäuregruppen ergeben bzw. wie sich deren Abhängigkeit unter wechselnden Umweltbedingungen entwickelt.

5.1 Analyse von *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten

5.1.1 *VHR1*-,*NQM1* - Deletionen im Zusammenhang mit chronologischem Altern

In der vorliegenden Arbeit wurden Gene, welche zuvor in den Zusammenhang der Regulation des chronologischen Alterns bei *S. cerevisiae* gebracht wurden [104], in Hinblick auf mögliche genetische Interaktionen untersucht. Da für den Großteil dieser Gene die spezifische Funktion bzw. deren Assoziation zu bereits bekannten Regulatoren des chronologischen Alterns in Hefe noch relativ unbekannt war, wurde diesbezüglich eine Kollektion an heterozygoten Doppelmutanten erzeugt, um eventuell bestehende und sich, in diesem Zusammenhang vorteilhaft auf die chronologische Lebensspanne auswirkende, Interaktionen mittels eines kompetitiven Haploprofizienzcreens nachzuweisen. Im Ergebnis des Haploprofizienzcreens konnte eine signifikante Anreicherung einer Doppelmutante, welche für die beiden Gene *VHR1* und *NQM1* heterozygot war, identifiziert werden.

Von *VHR1* war bereits bekannt, dass der Transkriptionsfaktor an der Regulation von *VHT1* (Vitamin H - Transporter 1) und *BIO5* (Transporter von Vorläufermolekülen zur Biotinbiosynthese) beteiligt ist [134] und dass seine Expression durch chemischen Stress induziert wird [135]. Für *NQM1* war neben der Kristallstruktur noch bekannt, dass die typische Transaldolasenreaktion der reversiblen Umsetzung von Erythrose-4-phosphat und Fructose-6-phosphat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Sedoheptulose-7-phosphat bereits *in vitro* demonstriert wurde [122].

Im Allgemeinen ist die Dynamik bzw. die Prozesse, welche die Lebensdauer von Hefemutanten während eines solchen kompetitiven chronologischen Alterungsexperiments beeinflussen sehr komplex. So werden neben den zahlreichen intrinsischen Alterungsfaktoren wie beispielsweise gesteigerte intrazelluläre Beschädigung durch erhöhten oxidativen Stress, Telomerverkürzung, Fehlfunktionen von Mitochondrien, DNA Mutationen, epigenetische Veränderungen mit Auswirkung auf die generelle Genomstabilität sowie eine erhöhte Proteotoxizität auch exogene Faktoren als Ursache des chronologischen Alterungsprozesses diskutiert [57, 136–139]. Um Unterschied zu den intrinsischen Faktoren wirken sich die exogenen Faktoren in der Regel indirekt auf die Fitness der zu untersuchenden Organismen (und damit auf deren Lebenspanne) aus, ohne dabei direkt die deletierten Gene zu berücksichtigen. Diese

exogenen Alterungsfaktoren umfassen dabei die zugrundeliegenden Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen selbst, aber auch Stoffe, die sich während des Verlaufs der chronologischen Alterungsexperimente innerhalb des Kulturmediums bilden. So wird beispielsweise Glucose selbst als limitierender Faktor für die Lebensspanne diskutiert [140]. Prinzipiell werden Untersuchungen zum chronologischen Altern in synthetischem Kompletmedium (SC) mit 2% Glucose als Standardzuckerkonzentration durchgeführt. Nach ca. 12 Stunden ist die Konzentration von Glucose im Kulturmedium jedoch kaum noch nachweisbar, was durch den erhöhten Umsatz der Glucose durch die Hefekulturen erklärbar ist [140]. Es wurde bereits demonstriert, dass die Glucosekonzentration einen Effekt auf die chronologische Lebensspanne haben kann. So zeigt sich bei einer Reduktion der Glucosekonzentration von 2% auf 0.5% bzw. 0.05% im Kulturmedium eine deutlich verlängerte chronologische Lebensspanne (Kalorierestriktion). Zusätzlich wird neben der Wirkung der nährstoffsensitiven Kinasen (Tor, Ras/PKA, Sch9) diskutiert, dass die zelluläre Antwort auf Kalorierestriktion über zahlreiche stressspezifische sowie generelle Transkriptionsfaktoren wie Yap1p, Msn2/4p, Hsf1p und Hog1p/Hot1p vermittelt wird [124, 141, 142]. Diese Faktoren induzieren als transkriptionelle Stressantwort unter anderem die Expression von Antioxidanzenzymen und reduzieren dadurch oxidativen Stress, welcher charakteristisch für alternde Kulturen ist [143]. Weiterhin können diese Faktoren eine generelle Stressresistenz in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit oder anderen Umweltfaktoren auslösen und dabei auch andere Prozesse wie Autophagie, Proteinsynthese und die Funktion der Mitochondrien beeinflussen [73], welche alle bereits im Kontext der Regulation des Alterns aufgefallen sind.

Der Metabolismus von Glucose auf primär fermentativen Weg führt zu weiteren Faktoren, welche die Lebensspanne innerhalb kompetitiver Alterungskulturen beeinflussen können. Glucose wird dabei fermentativ zu Ethanol umgesetzt. Sobald Glucose zum limitierenden Faktor wird, erfolgt im Metabolismus eine Umstellung von fermentativen zu respirativen Metabolismus, wobei Ethanol dabei respirativ zu Essigsäure umgesetzt wird. Die damit verbundenen Änderungen im pH-Wert des Kulturmediums bzw. die ansteigende Azidifizierung des Mediums können sich ebenfalls auf die Dauer der chronologischen Lebensspanne auswirken [140]. Dabei wird angenommen, dass die exogen im Medium entstehende Essigsäure in ihrer protonierten Form die Plasmamembran überschreiten kann und als Resultat zur Azidifizierung des intrazellulären Milieus führt. Diese Anreicherung von Essigsäure

im intrazellulären Milieu führt nachfolgend zur Aktivierung des programmierten Zelltods (Apoptose) [144]. Das apoptotische Programm ist in der Regel begleitet von den typischen apoptotischen Merkmalen wie der Kondensation der Chromosomen, Fragmentierung, Exposition von Phosphatidylserin sowie der Freisetzung von Cytochrom *c* und der Depolarisierung der Mitochondrienmembran [62, 143, 145]. Bei chronologisch gealterten Hefekulturen wurden diese typischen Apoptosemarker ebenfalls identifiziert und weiterhin konnte demonstriert werden, dass sich die chronologische Lebensspanne von Hefekulturen durch eine Deletion in dem Metacaspasegen *YCA1* verlängern lässt [143]. Generell äußert sich die Auslösung eines apoptotischen Programms nicht nur negativ auf die Kulturen. So wird u.a. diskutiert, dass besonders ältere Organismen bewusst einen apoptotischen Zelltod wählen, um den verbleibenden jüngeren Organismen Nährstoffe zum weiteren Überleben bereit zu stellen und sich damit sozusagen altruistisch zum Erhalt ihrer Population opfern. Diese Hypothese wurde von Fabrizio *et al.* formuliert [62]. Im Detail wurde gezeigt, dass sich nach 10 Tagen eines chronologischen Alterungsexperiments ein adaptives Neuwachstum [engl. adaptive Regrowth] einzelner Mutanten zeigte, welches u.a. bereits für stationäre Bakterienkulturen bekannt war [146]. Das adaptive Neuwachstum sicherte damit den Fortbestand der Population in einer sich verändernden Umwelt.

Das generelle Verhältnis der Nährstoffe in chronologischen Alterungskulturen wird ebenfalls zunehmend als Regulator des Alterns diskutiert [147, 148]. So wurde bspw. gezeigt, dass die Ammoniumkonzentration, speziell bei Aminosäure-auxotrophen Stämmen drastische Effekte auf die chronologische Lebensspanne haben kann und dass die dabei auftretenden Effekte speziell von der jeweiligen limitierten Aminosäure abhängen [149, 150]. Die Wirkung von Aminosäuren bei der Regulation der chronologischen Lebensspanne wurde besonders für die Aminosäuren Glutamat, Methionin und Leucin dokumentiert [151, 152]. Dabei zeigten sich bei einer Verminderung der Methioninkonzentration oder bei einer Erhöhung der Glutamat- bzw. Leucinkonzentration positive Effekte auf die Lebensdauer. Dass die Auxotrophie der zugrundeliegenden Kulturen auch direkten Einfluss auf die zu untersuchenden physiologischen Parameter haben kann, wurde zudem durch Müllleder *et al.* aufgezeigt [107].

Zusammengefasst könnten daher alle Faktoren die sich positiv auf einen oder mehrere der erwähnten Prozesse auswirken (bspw. eine erhöhte generelle Stressresistenz) zur

Anreicherung der heterozygoten *VHR1/NQM1* - Doppelmutante in den kompetitiven Alterungsexperimenten geführt haben.

Der Überlebensvorteil der heterozygoten *VHR1/NQM1* - Doppelmutante wurde neben dem komplexen kompetitiven Wettbewerbsexperiment ebenfalls individuell für haploide, diploid heterozygote und prototrophe Kulturen in nicht-kompetitiver Umgebung analysiert und gleichzeitig bestätigt (vgl. Abschnitt 4.1.4 Abbildung 8/9/10). Die Unterschiede vom kompetitiven zum nicht-kompetitiven chronologischen Altern waren dabei u.a. an der Dauer des Experiments ersichtlich. Während das kompetitive Altern über einen Zeitraum von 32 Tagen beobachtet wurde, zeigte sich besonders bei den haploiden Hefekulturen eine deutlich kürzere Lebensdauer in nicht-kompetitiver Umgebung. Die Ursache dafür könnte in der Präsenz des *LEU2* - Auxotrophiemarkers begründet sein, der zur Herstellung der diploid heterozygoten Doppeldeletionsbank verwendet wurde. Die positiven Effekte von Leucin auf die chronologische Lebensspanne wurden bereits demonstriert [152]. Zudem zeigte sich im Vergleich zu den prototrophen Stämmen (vgl. Abschnitt 4.1.4 Abbildung 10), bei denen die Auxotrophie durch die Präsenz des Plasmids pHLUM aufgehoben wurde, eine deutlich verlängerte Lebensspanne, was zusätzlich die Hypothese der positiven Aminosäureeffekte bestätigt. Bei den nicht-kompetitiven Alterungsexperimenten war vor allem auffällig, dass sich der Überlebensvorteil der $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante nicht in dem klassischen Phänotyp des chronologischen Alterns manifestierte, welcher durch ein zeitlich früheres Absterben des Wildtyps charakterisiert ist, sondern als gesteigerte Klonogenizität der $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante zu einem späteren Zeitpunkt der stationären Phase. Obwohl dieser Phänotyp vom klassischen Phänotyp abweicht, wurde er dennoch bereits in anderen Studien beobachtet [153]. Es ist daher möglich, dass die $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante dadurch eine erhöhte Viabilität innerhalb der stationären Phase aufweist, da sie eventuell effizienter im adaptiven Neuwachstum ist [62]. Daher wird der hier präsentierte Phänotyp vom kanonischen Phänotyp des chronologischen Alterns unterschieden und fortlaufend als Phänotyp des gesteigerten Überlebens innerhalb der späten stationären Phase definiert. Im Allgemeinen ergibt sich durch die gesteigerte Fähigkeit des erneuten adaptiven Wachstums innerhalb von alternden Kulturen die Möglichkeit, speziell bei schwierigen Umweltbedingungen wie bspw. erhöhtem Nährstoffmangel/Nährstofflimitierung den Fortbestand der Population zu sichern.

5.1.2 *VHR1*-, *NQM1* - Mutanten zeigen charakteristische Metabolitprofile

Da *NQM1* ein Paralog zu der im PPP aktiven Transaldolase 1 (*TAL1*) darstellt, wurde untersucht inwiefern $\Delta vhr1$ und $\Delta nqm1$ - Mutanten ebenfalls charakteristische Metabolitenverteilungsprofile aufweisen, wodurch sich Rückschlüsse auf die funktionelle Lokalisation der Gene ziehen lassen. Typischerweise zeigt bspw. eine *TAL1* - Deletion eine Akkumulation ihres katalytischen Edukts Sedoheptulose-7-phosphat [6,8].

Im Ergebnis des Metabolitenverteilungsprofils zeigte sich ein Einfluss der Deletionen von *VHR1* und *NQM1* auf die Zuckerphosphatmetaboliten des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels am Beispiel von Glycolyse und PPP (vgl. Abschnitt 4.2.1 Abbildung 11). Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten und ihrem jeweiligen Ploidigrad. Während haploide $\Delta vhr1$ und $\Delta nqm1$ - Mutanten verringerte Konzentration der Metaboliten der oberen Glycolyse bzw. des PPP aufwiesen, zeigte sich bei den heterozygoten Mutanten ein potentiell umgekehrter Phänotyp. Für humane Zelllinien wurden bei einer Transaldolasedefizienz bereits erhöhte Aktivitäten der beiden Enzyme des oxidativen PPP Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase sowie 6-Phosphogluconatdehydrogenase festgestellt, was eventuell mit den hier aufgeführten geringen Konzentrationen der oxidativen PPP-Metabolite korrelieren könnte [154]. Die höchsten Konzentrationen im haploiden Zustand wurden besonders bei Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) und 2-/3-Phosphoglycerat(2PG, 3PG) beobachtet. Die Akkumulation von G3P könnte in der Deletion der Transaldolase *NQM1*, welche G3P zur Katalyse verwendet, begründet sein. Die ebenfalls erhöhten Konzentrationen der nachfolgenden Metaboliten 2PG und 3PG könnten ebenfalls mit der *NQM1* - Deletion in Zusammenhang stehen. Der genaue Mechanismus dahinter ist noch nicht genau aufgeklärt, jedoch gibt es Hinweise dass zwischen den Genen der Phosphoglyceratmutase (*GPM1*) und der Transaldolase *NQM1* ein funktioneller Zusammenhang besteht. Eine Untersuchung von Phosphoglyceratmutasemutanten unter gluconeogenetischen Bedingungen zeigte, dass bei einer *GPM1* - Deletion u.a. *NQM1* eines der am höchsten exprimierten Gene überhaupt ist [155]. Daher ist es vorstellbar, dass eine umgekehrte Deletion von *NQM1* in einer Akkumulation von 2PG/3PG resultiert. Diese Annahme wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht überprüft und muss daher in weiterführenden Studien aufgeklärt

werden, wobei darauf hingewiesen werden muss, dass eine *GPM1* - Deletion bei Abkömmlingen des parentalen Hefestamms S288C nicht lebensfähig ist. Unabhängig davon lässt sich trotzdem bereits eine Funktion von *NQM1* unter gluconeogenetischen Bedingungen vermuten, welche gleichzeitig für alternde Kulturen eine Relevanz hätte, da sich während des chronologischen Alterns eine Verschiebung des Metabolismus von fermentativen auf einen vermehrt gluconeogenetischen Metabolismus vollzieht. Beim Vorhandensein eines funktionellen *NQM1* - Allels zeigte sich diese Akkumulation von G3P sowie den nachfolgenden Metaboliten jedoch nicht. Interessanterweise zeigten im heterozygoten Zustand vermehrt die PPP-Metaboliten in den *VHR1* und *NQM1* - Mutanten erhöhte Konzentrationen. Generell konnte beobachtet werden, dass sich die Metabolitprofile von $\Delta vhr1$ und $\Delta nqm1$ - Mutanten ähnlicher sind. Die Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ zeigte größtenteils einen abgeschwächten bzw. inversen Phänotyp bezüglich ihrer Metabolitkonzentrationen. Über die Funktion des Transkriptionsfaktors *VHR1* lassen sich aufgrund der vorliegenden Metabolitprofile jedoch nur schwer Aussagen treffen. Offensichtlich zeigen sich bei einer *VHR1* - Deletion ebenso weitreichende Auswirkungen wie bei einer *NQM1* - Deletion. Inwiefern *VHR1* hingegen generell an der Regulation von Glycolyse bzw. PPP-assoziierten Genen beteiligt ist bleibt bisher weiterhin ungeklärt. Aufgrund seiner bekannten Funktion, der Regulation von Biotin-abhängigen Transportern bzw. Biosynthesegenen [134], lässt sich aber eine Korrelation zu nährstoffumsetzenden Prozessen ableiten. Studien des ribosomalen Transkriptionsfaktors Ifh1p zeigten eine Assoziation von Ifh1p mit TORC1, wobei TORC1 dabei die dynamische Acetylierung und Phosphorylierung von Ifh1p in Abhängigkeit des Nährstoffangebots regulierte [156]. Innerhalb der Studie wurde zudem über Chromatin-Immunoprecipitations-Sequenzierung (ChIP-Seq) - Daten gezeigt, dass Ifh1p in der Lage ist an den genomischen Locus von *VHR1* zu binden [156]. Daher könnte es möglich sein, dass *VHR1* auf indirekten Weg ebenfalls in bekannten nährstoffsensitiven Signalwegen eine Funktion erfüllt.

Neben den glykolytischen und PPP-assoziierten Zuckerphosphaten wurde zusätzlich die Verteilung der Zuckeralkohole (Alditole/Polyole) in $\Delta vhr1$ und $\Delta nqm1$ - Mutanten analysiert (vgl. Abschnitt 4.2.2 Abbildung 12). Polyole sind niedermolekulare, lösliche Verbindungen, welche sich in vielen Organismen als Antwort auf primär Salz- und osmotischen Stress intrazellulär akkumulieren. Sie werden gemeinhin als kompatible Substanzen bezeichnet, da ihre Anwesenheit bzw. ihre Akkumulation

nicht mit dem zellulären Stoffwechsel interferiert. Polyole sind für ihre protektiven Eigenschaften in zahlreichen Organismen bekannt. Sie sind beteiligt an der Osmoregulation, der Abwehr von oxidativem Stress und dienen zusätzlich als Kohlenhydratspeicherstoffe [157,158]. Für die quantifizierten Polyole zeigte sich größtenteils über alle untersuchten Deletionsstämme, dass ihre Konzentrationen im Vergleich zum Wildtyp verringert waren. Erhöhte Konzentrationen wurden sowohl in den haploiden und heterozygoten Mutanten nur bei Sedoheptulose festgestellt. Weiterhin fanden sich erhöhte Konzentrationen bei Threitol ($\Delta vhr1$) sowie bei Erythritol und Xylitol in der heterozygoten $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante. Die intrazellulären Polyole entstehen durch Umwandlung der Zuckerphosphatmetaboliten, wobei dafür, in Abhängigkeit des jeweiligen Polyols, mehrere Zwischenschritte notwendig sind. Polyole sollten aus diesem Grund die Verteilung der Zuckerphosphate widerspiegeln können.

Für Arabitol, welches osmoprotektive Eigenschaften aufweist [159] und aus den PPP-Metaboliten Ribulose-5-phosphat/Xylulose-5-phosphat (RI5P/X5P) über die Zwischenstufen Ribulose/Xylulose entsteht [160], zeigte sich für die haploiden Stämme ein analoges Bild zur Zuckerphosphatkonzentration. Interessanterweise verblieben die Arabitolkonzentrationen in den heterozygoten Mutanten weiterhin verringert, obwohl die Zuckerphosphate erhöht waren.

Mannitol zählt zu den am meisten verbreiteten Polyolen der Biosphäre und ist speziell im Reich der Pilze eines der am häufigsten vorkommenden löslichen Kohlenhydrate in Mycelen und Fruchtkörpern [161]. Bei Pilzen wurden zahlreiche Funktionen von Mannitol und dessen Metabolismus postuliert, wobei Mannitol dabei als Speicherkohlenhydrat, zur NADPH-Regeneration und zur Abwehr von umweltbedingtem Stress Verwendung findet [162]. Mannitol geht aus Fructose bzw. Fructose-6-phosphat (F6P) hervor [161]. Für Mannitol war im Falle der haploiden Stämme ebenfalls zu beobachten, dass die geringen Zuckerphosphatkonzentrationen in ebenso geringen Polyolkonzentrationen resultierten. Im heterozygoten Zustand schien die Polyolverteilung nicht direkt die Zuckerphosphatverteilung widerzuspiegeln. Dies kann darin begründet sein, dass Glucose-6-phosphat (G6P) und F6P als Summe quantifiziert wurden. Zudem wurde die Konzentration von Fructose nicht bestimmt, welches auch auf direktem Weg zu Mannitol umgesetzt werden kann. F6P wird über den Zwischenschritt mit der Bildung von Mannitol-1-Phosphat zu Mannitol konvertiert [161].

Ribitol findet vor allem Verwendung als Bestandteil von Riboflavin (Vitamin B₂) und ist damit Teil des Coenzym FAD⁺, welches als ein bedeutender Elektronendonator bzw. Akzeptor in verschiedenen Stoffwechselprozessen wie bspw. der oxidativen Phosphorylierung sowie der β -Oxidation von Fettsäuren Anwendung findet. Ob Ribitol daneben noch andere biologische Funktionen erfüllt ist bisher nicht bekannt. Ribitol wird auf ähnlichen Weg wie Arabitol über RI5P synthetisiert und spiegelt für die haploiden Mutanten die Verteilung der Zuckerphosphate wider. Analog zu Arabitol zeigte sich jedoch bei den heterozygoten Stämmen ein gegensätzliches Bild mit verringerten Polyolkonzentrationen bei erhöhten Zuckerphosphaten.

Wie bereits eingangs erwähnt, zeigten sich für Sedoheptulose erhöhte Konzentrationen in den haploiden bzw. heterozygoten Mutanten. Da das korrespondierende Zuckerphosphat Sedoheptulose-7-phosphat (S7P) nicht quantifiziert werden konnte, kann über die relative Konzentration nur spekuliert werden. Ausgehend von den erhöhten Sedoheptulosewerten lässt sich für die haploiden Mutanten vermuten, dass S7P ebenfalls in erhöhter Konzentration vorlag, da einerseits Sedoheptulose aus S7P hervorgeht und andererseits die Mutanten gleichzeitig erhöhte G3P-Konzentrationen aufwiesen, welches als Nebenprodukt der Transaldolasenreaktion auftritt. Demnach müssten aufgrund der deletierten Transaldolase eventuell verringerte Konzentrationen an F6P und Erythrose-4-phosphat (E4P) zu erwarten sein. Die Konzentrationen von F6P wurden hier als Summe mit G6P bestimmt und zeigten verringerte Werte. E4P konnte hier ebenfalls nicht quantifiziert werden, jedoch lässt sich aufgrund der verringerten Konzentration an Erythritol, welches aus E4P unter Bildung des Zwischenprodukts Erythrose hervorgeht [163], annehmen, dass die E4P-Konzentration ebenfalls verringert sein könnte. Für die heterozygoten Mutanten schien die umgekehrte Transaldolasenreaktion mehr wahrscheinlich zu sein, dass sich einerseits erhöhte F6P Konzentrationen und generell erhöhte PPP-Metabolitkonzentrationen und damit eventuell auch E4P-Konzentrationen ergeben würden. Indikativ dafür sind auch die erhöhten Erythritolkonzentrationen. Daher könnte S7P und G3P entstehen, wobei letzteres effizienter weiter verstoffwechselt wird, da die für die haploiden Mutanten beobachtete Akkumulation ausbleibt. Generell kann S7P auch durch die Transketolasereaktion gebildet werden, wobei dabei ein C₂-Körper von X5P auf Ribose-5-phosphat (R5P) übertragen wird und somit zur Entstehung von S7P und G3P führt. Da einige, für das Verständnis des Mechanismus essentiellen Metaboliten nicht quantifiziert werden konnten, und weiterhin das *NQM1* - Paralog

TAL1 in den Mutanten funktionell war, verbleibt die beschriebene Reaktionskette bis auf weiteres spekulativ.

Für Sorbitol, dessen zelluläre Funktion ähnlich zu der von Glycerol in der Abwehr von osmotischen Stress liegt [164] und welches direkt aus Glucose bzw. Fructose hervorgeht, lässt sich ebenfalls ein logischer Zusammenhang der Zuckerphosphat- und Polyolprofile vermuten. Obwohl Glucose und Fructose nicht direkt quantifiziert werden konnten, zeigten die nachfolgenden Umwandlungsprodukte G6P/F6P im haploiden Zustand der Mutanten leicht verringerte und im heterozygoten Zustand leicht erhöhte, aber dennoch nahe am Wildtyplevel liegende Konzentrationen. Ähnlich verhielten sich dazu die Sorbitolwerte.

Die Polyolverteilung für Threitol kann nicht direkt mit dem korrespondierenden Zuckerphosphat E4P korreliert werden. Besonders für die heterozygoten Mutanten zeigten sich bei erhöhten Erythritolwerten, woraus sich ebenfalls erhöhte E4P-Konzentrationen vermuten lassen, stark verringerte Threitolwerte. Threitol wird prinzipiell aus E4P synthetisiert, wird aber vorher zu Threose-4-Phosphat epimerisiert bzw. isomerisiert und nachfolgend durch eine NADPH-abhängige Polyoldehydrogenase reduziert und zusätzlich mittels einer Zuckerphosphatase dephosphoryliert und somit in Threitol überführt [165]. Aufgrund dieser Zwischenschritte, welche hier nicht untersucht wurden, ist die Aufklärung des Threitolprofils nicht möglich. Für Threitol sind bis heute keine genauen biologischen Funktionsmechanismen bekannt. Die Synthese von Xylitol erfolgt ausgehend von X5P über den Zwischenschritt der Bildung von Xylulose [166]. Während die haploiden Polyolprofile aus den Zuckerphosphaten hervorgehen könnten, was sich anhand der verringerten X5P bei gleichzeitig verringerten Xylitolkonzentrationen vermuten lässt, zeigten die heterozygoten Mutanten, obwohl die Konzentrationen von RI5P bzw. X5P erhöht waren, weiterhin verringerte Xylitolkonzentrationen. Nur bei der heterozygoten $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante traten erhöhte Xylitolkonzentration auf. Die Ursache dafür bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Die biologische Funktion von Xylitol ist bis heute ungeklärt. Zusammenfassend lässt sich im Vergleich der Zuckerphosphat- und Polyolprofile sagen, dass sich Deletionen in den Genen *VHR1* und *NQM1* auf die zentralen Metaboliten von Glycolyse und PPP auswirken und zu zahlreichen Konzentrationsveränderungen führen können. Die genaue Verteilung der Metaboliten ist dabei nicht abschließend im Detail erklärbar, da dazu zusätzlich weitere Untersuchungen bezüglich der Enzymaktivitäten sowie eine Ausweitung der Metabolitenprofile auf

bisher nicht quantifizierte Metaboliten notwendig wäre. Dennoch konnten für einige Zuckerphosphate und deren korrespondierenden Polyole korrelative Bezüge geknüpft werden. Um die Frage zu klären, inwiefern sich die metabolischen Veränderungen langfristig auf die Fitness unter bspw. umweltbedingtem Nährstoffmangel auswirken sind ebenfalls zusätzliche Studien erforderlich. Im Hinblick auf die langfristige Aufrechterhaltung der physiologischen Funktionen der Zelle kann man dennoch festhalten, dass es unter sich verändernden Umweltbedingungen, speziell bei Nährstofflimitierung, häufig zu einer Umstellung des Metabolismus kommt. Einer der bekanntesten Umstellungsprozesse bezieht sich dabei auf den Wechsel von glykolytischen hin zu gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen, gemeinhin als diauxische Verschiebung [engl.: diauxic shift] bezeichnet. Systemweite Untersuchungen mit *S. cerevisiae* haben dabei ergeben, dass die Funktion der Transaldolasen zu späteren Zeiten (nach Glucoseverbrauch) besonders wichtig werden, da sie zusammen mit den Transketolasen unter gluconeogenetischen Bedingungen weiterhin die Synthese der zum Aufbau von Biomasse notwendigen Metaboliten R5P und E4P ermöglichen [167].

Damit lässt sich für die Transaldolasen festhalten, dass ihre Funktionen im Stoffwechsel offenbar von größerer Bedeutung sind als bisher angenommen. Indem Transaldolasen die Balance zwischen dem oxidativen und nicht-oxidativen Teil des PPP regulieren, nehmen sie direkt Einfluss auf die Level der als Antioxidanzien wirkenden Metabolite bzw. Peptide NADPH und GSH und sind damit an der Beseitigung von oxidativem Stress beteiligt und beeinflussen zusätzlich die zelluläre Antwort auf apoptotische Signale [168]. Gleichzeitig kommt es durch die Verschiebungen im Kohlenhydratstoffwechsel zur Bildung von Polyolen, welche zahlreiche zytoprotektive Eigenschaften aufweisen, sodass sich die Vermutung äußern lässt, dass die Zelle durch die Kombination all dieser Faktoren eine adäquate Antwort auf potentiell auftretenden Umweltstress geben kann.

5.1.3 Die Regulation von NQM1 durch VHR1 ist spezifisch unter diversen Bedingungen

Eukaryotische Zellen zeichnen sich durch eine Vielzahl regulativer Mechanismen aus, um ihre intrazelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten. Dies bedeutet unter anderem, dass sie in der Lage sind ihren Metabolismus als Antwort auf verschie-

dene Stressquellen wie bspw. oxidativen/reduktiven Stress, osmotische Störungen, Toxine, Temperaturschwankungen oder variierende Nährstoffverfügbarkeiten anzupassen [5, 169–172]. Die Fähigkeit der Zelle auf diese Reize zu reagieren und mit Hilfe spezieller Abwehrmechanismen gegen die Stressquelle vorzugehen ist dabei überlebenswichtig für die Zelle. Besonders für alternde Zellen sind diese Mechanismen essentiell und überlebenswichtig. Neben der dynamischen Flexibilität des Metabolismus in Bezug auf die Stressabwehr konnte ebenfalls die Rolle der transkriptionellen Regulation als adaptive Antwort auf Stress demonstriert werden. Dabei wurden u.a. stressabhängige Gene sowie regulatorische Systeme zur Stressabwehr identifiziert [173–176]. Die transkriptionelle Stressantwort ist dabei in der Regel spezifisch für den auftretenden Stress und variiert demnach unter verschiedenen Bedingungen. Dennoch lassen sich u.a. Gene und Kontrollmechanismen identifizieren, welche generell eine übergreifende Funktion in der Abwehr von diversen Stressarten aufweisen. Einige dieser Gene wurden bereits im vorigen Abschnitt erwähnt und gewährleisten die transkriptionelle Antwort auf Stress. Dazu zählen u.a. Yap1p, Msn2/4p, Hsf1p, sowie das Hog1p/Hot1p - System [124, 141, 142]. Durch diese Regulatoren wird der Zelle ermöglicht, sich direkt gegen den vorliegenden Stress zu wehren, indem es bspw. die Induktion effizienter Abwehrmechanismen wie Chaperone und Antioxidanzproteine einleitet. Jedoch sind die transkriptionellen Regulatoren nicht die einzigen wichtigen Vermittler auf sich verändernde Umwelt- bzw. Nährstoffmangelbedingungen [27, 103, 177]. Es hat sich gezeigt, dass der zelluläre Metabolismus ebenfalls eine wichtige Funktion in der Abwehr umweltbedingter Störungen erfüllt. Die primäre Herausforderung für die Zelle besteht unter diesen Bedingungen darin, den zellulären Stoffwechsel aufrecht zu erhalten und dabei gleichzeitig die erforderlichen Anteile an Metaboliten sowie Cofaktoren wie ATP und NADPH zu garantieren, um der Zelle damit ein Überleben innerhalb der Stressphase und darüber hinaus zu gewährleisten. Es hat sich bereits gezeigt, dass die Stoffwechselwege Glycolyse und PPP sowie die Aminosäure- und Polyaminsynthese dabei eine zentrale Funktion erfüllen, da sie zu einer schnellen und effektiven Abwehr von bspw. oxidativen Stress führen, ohne dass zuvor eine transkriptionelle Antwort vorausgeht [5, 6, 8, 173, 178].

Ein wichtiger Faktor, der eine schnelle adaptive Stressantwort auf der Ebene der Metaboliten bzw. der genomischen Ebene während der Evolution ermöglicht hat, war die Duplikation von gesamten Genomen, wobei speziell im Reich der Pflanzen die höchsten Grade an Polyploidien beobachtet werden [179, 180]. Für *S. cerevisiae*

wurde ebenfalls eine Genomduplikation vor 100 Millionen Jahren datiert [181]. Diese Genomduplikation kann als Ausgangspunkt zur Evolution von Isoenzymen gedient haben, welche nachträglich eine funktionelle Spezialisierung hinsichtlich der Abwehr von diversen Stressarten ermöglichten [182, 183]. Funktionelle Separierungen, speziell unter Stressbedingungen, wurden bereits für einige Isoenzyme wie bspw. Isocitratdehydrogenasen [184, 185], Alkoholdehydrogenasen [186], Sirtuine [187, 188], Nährstofftransporter [189] und glykolytische Enzyme beschrieben [5].

Für die Transaldolase *NQM1* wurde zuvor *in vitro* demonstriert, dass sie prinzipiell dieselben katalytischen Eigenschaften zu ihrem direkten Paralog *TAL1* aufweist [122]. Unter normalen Laborbedingungen ist *TAL1* jedoch ausreichend um die Aktivität des PPP zu garantieren. Daher wurde vermutet, dass *NQM1* eventuell unter anderen Wachstums- bzw. Umweltbedingungen eine Funktion erfüllt [123], welche entweder direkt im Metabolismus der Gluconeogenese angelegt ist oder für die Bereitstellung von Vorläufermetaboliten aus dem PPP, unter Bedingungen in denen die normale Synthese über Glucose-6-phosphat behindert wird, zur nachfolgenden Synthese von Aminosäure- bzw. Nukleinsäurevorläufern benötigt wird. Demnach könnte *NQM1* ebenfalls ein Beispiel der funktionellen Separierung von Isoenzymen darstellen.

In der vorliegenden Dissertation konnte demonstriert werden, dass *NQM1* vermehrt unter gluconeogenetischen Bedingungen exprimiert wird (vgl. Abschnitt 4.2.3 Abbildung 13). Die Aktivität von *NQM1* war dabei unabhängig von ihrem Paralog *TAL1*, welches eine konstante Expression unter den getesteten Kohlenstoffquellen (Glucose, Galactose, Glycerol) aufwies und nur unter Ethanol eine minimal erhöhte Expression zeigte, welche jedoch im Vergleich zur Expression von *NQM1* deutlich geringer war. Weiterhin konnte deutlich gezeigt werden, dass *NQM1* ein durch Glucose reprimiert wird, was durch Expressionanalysen unter Kalorierestriktion bestätigt wurde und dass diese Repression ebenfalls unabhängig von ihrem Paralog *TAL1* erfolgt (vgl. Abschnitt 4.2.4 Abbildung 14).

Da *NQM1* ursprünglich im Kontext mit *VHR1* während des initialen Haploprofizienzscreen aufgetaucht ist, wurde weiterhin die Interaktion von *VHR1* und *NQM1* untersucht. Das DNA-Bindemotiv von Vhr1p wurde erst kürzlich aufgeklärt [190]. In dem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass Vhr1p prinzipiell in der Lage ist bZIP (basische Leucin-Zipper) sowie Gcn4p-ähnliche Motive zu binden [190]. Auch wenn für den genomischen *NQM1* - Locus noch keine direkten Bindungsstellen nachgewiesen wurden (Yeasttract Datenbank), was eventuell auf die

erst kürzlich erfolgte Aufklärung des *VHR* - Motivs zurückzuführen ist, konnten dennoch Bindungsstellen für Gcn4p sowie für die zuvor angesprochenen generellen stressinduzierten Transkriptionsfaktoren Yap1p, Hsf1p, Msn2/4p im *NQM1* - Lokus identifiziert werden (Yeasttract Datenbank). Der experimentelle Nachweis der Bindung von *VHR1* im *NQM1* - Lokus ist zwar noch nicht vollständig erbracht, jedoch weisen die Gnc4p-Bindungsmotive sowie die Fähigkeit von Vhr1p zur Bindung Gnc4p-ähnlicher DNA-Motive daraufhin, dass vermutlich eine Verbindung von *VHR1* zu *NQM1* besteht, wobei weiterhin ungeklärt ist, ob diese Verbindung direkt oder indirekt erfolgt.

Weitere experimentelle Beweise für eine Interaktion zwischen *VHR1* und *NQM1* konnten im Rahmen der beschriebenen Ergebnisse aufgezeigt werden. So zeigte sich bei den Analysen zur Expression von *NQM1* in der Mutante $\Delta vhr1$ eine Abhängigkeit der beiden Gene unter verschiedenen Kohlenstoffquellen sowie unter Kalorierestriktion. Die Deletion des *VHR1* - Transkriptionsfaktors war dabei nicht generell reprimierend für die *NQM1* - Expression. Jedoch zeigte sich bei vorliegender *VHR1* - Deletion eine deutliche reduzierte Expression von *NQM1*. Das generelle Induktionsmuster von *NQM1* unter variierenden Kohlenstoffquellen bzw. unter Kalorierestriktion sowie die Expression von *TAL1* wurden durch eine *VHR1* - Deletion jedoch nicht beeinflusst (vgl. Abschnitt 4.2.5 Abbildung 15).

Dem Einfluss von oxidativen und osmotischen Stress in der Regulation des chronologischen Alterns wurde bereits eine bedeutende Rolle zugesprochen [125–129]. Beispielsweise wurde an fünf Tage alten Hefekulturen gezeigt, dass sie reduzierte Level an Glutathion (GSH), Superoxiddismutase (SOD), eine erhöhte Katalaseaktivität sowie erhöhte Level an ROS und carbonylierten Proteinen aufwiesen, was auf eine, durch oxidativen Stress geprägte, Umgebung hindeutete [191]. Die Fähigkeit von Zellen sich diesen auftretenden Störungen anzupassen verleiht den Zellen unter Umständen Vorteile unter kompetitiven Wachstumsbedingungen. In der Tat konnte durch Stresstoleranztests gegenüber verschiedenen Oxidanzien und Reduktanzien gezeigt werden, dass sich *VHR1* und *NQM1* - Deletionen durch erhöhte Resistenz- und Sensitivitätsphänotypen, in Abhängigkeit der getesteten Substanz, auszeichnen (vgl. Abschnitt 4.2.7). Beispielsweise zeigte die haploide Mutante $\Delta vhr1$ und die haploide Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ eine gesteigerte Resistenz gegenüber Menadion, während die Mutante $\Delta nqm1$ gegenüber Menadion sensitiv war. Die Mutante $\Delta nqm1$ zeigte jedoch gegenüber erhöhten H_2O_2 Konzen-

trationen, im Gegensatz zu den anderen Stämmen (besonders bei $\Delta tal1$ -assoziierten Doppel- bzw. Tripelmutanten), eine gesteigerte Resistenz (vgl. Abschnitt 4.2.7 Abbildung 21/24). In nachfolgenden Analysen der Expression von *NQM1* in der $\Delta vhr1$ - Mutante konnte zudem bestätigt werden, dass die Expression von *NQM1* unter dem Einfluss von H_2O_2 und Menadion induziert wird (vgl. Abschnitt 4.2.7 Abbildung 29). Interessanterweise verstärkte eine *VHR1* - Deletion im Fall von Menadionstress teilweise die Expression von *NQM1* im Vergleich zum Wildtyp. Die Reduktion von Menadion führt zur Bildung von Semiquinonradikalen, welche generell sehr instabil sind und ebenfalls sehr schnell mit Sauerstoff reagieren und so zur Bildung von ROS führen [192]. Eine Assoziation von *NQM1* zur Abwehr von Menadionstress wurde bereits indirekt durch Mikroarrayanalysen geknüpft [174]. Des Weiteren wurde eine durch Menadion hervorgerufene Toxizität durch verschiedene Studien mit einem Mangel an Glutathion in Verbindung gebracht [193–195]. Da innerhalb der hier vorliegenden Studie die Level an Glutathion nicht mit der *NQM1* - Aktivität in Verbindung gebracht wurden, kann nur spekuliert werden, dass der bei $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ aufgetretene Resistenzphänotyp eventuell durch erhöhte Glutathionlevel zu erklären ist. Transaldolasen wurden bereits zuvor mit der Regulation der Toleranz gegenüber Oxidanzien und der damit verbundenen auftretenden Apoptose in Verbindung gebracht. Für alternde Kulturen zeigte sich, dass Apoptose ein Mechanismus darstellt um das Überleben bestimmter Zellen in gepoolten Kulturen zu garantieren [196]. In dem Zusammenhang wurde demonstriert, dass reduzierte *TAL1* - Level mit erhöhten Glutathionleveln korrelierten und das nachfolgend die Sensitivität von Zellen gegenüber apoptotischen Signalen beeinflusste [168]. Auch wenn zuvor deutlich gemacht wurde, dass die Expression von *NQM1* unter dem Einfluss von Menadion induziert wird, erfolgte die Induktion erst nach 1.5 h. Demnach kann spekuliert werden, dass die Menadionresistenz von $\Delta vhr1$ und $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ dennoch durch die zu diesem Zeitpunkt noch reduzierten *NQM1* - Level bzw. *TAL1* - Level und damit verbundenen erhöhten Glutathionlevel ausgelöst worden sein kann und demnach die Induktion von *NQM1* erst in den nachfolgenden Adaptationsphase notwendig wird.

Unter H_2O_2 - Stress waren nur minimale Expressionsunterschiede zwischen Wildtyp und der Mutante $\Delta vhr1$ erkennbar. Die Stärke der Expression von *NQM1* war jedoch unter H_2O_2 (6-fach) geringer als bei Menadion (~ 45 -fach). In einer $\Delta yap1$ - Mutante konnten bereits Assoziationen zu der Expression von *NQM1* unter H_2O_2 - Stress

gezogen werden [174]. Somit lässt sich zusammenfassend eine Beteiligung von *NQM1* in der Abwehr von oxidativen Stress erkennen, wobei die Regulation von *NQM1* dabei weitestgehend unabhängig vom Transkriptionsfaktor *VHR1* erfolgt.

Studien zur Langzeitadaptation von Zellkulturen resultieren des Öfteren in einer Veränderung der Kulturmedienzusammensetzung. In der Regel metabolisieren Hefekulturen dabei primär Glucose durch anaeroben Metabolismus zu Ethanol. Während der fortschreitenden Inkubation führt die respirative Umsetzung von Ethanol zur Bildung von Essigsäure, welche daraufhin im Medium akkumuliert und zu einer Azidifizierung des Kulturmediums führt, wodurch ebenfalls die Überlebensfähigkeit der Zellen beeinflusst werden kann [140]. Neben diesen direkten metabolischen Effekten beeinflussen Änderungen in der Konzentration der gelösten Stoffe im Medium zusätzlich das osmotische Potential des Mediums. Dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Studie der Trend der Osmolalität des Mediums für die *VHR* und *NQM1* - Mutanten untersucht. Im Ergebnis konnte beobachtet werden, dass die Osmolalität während des chronologischen Alterungsexperiments in allen Medien für die getesteten Mutanten gesunken ist. Der stärkste Abfall der Osmolalität wurde im Medium der $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ - Doppelmutante verzeichnet (vgl. Abschnitt 4.2.6 Abbildung 19). Generell lassen sich durch den unterschiedlichen Verlauf der Osmolalität auch metabolische Unterschiede in den Mutanten vorhersagen, die, wie sich bereits gezeigt hat, tatsächlich vorlagen (vgl. Abschnitt 5.2). Da die Änderungen der Osmolalität jedoch im Vergleich zum Ausgangswert gering waren, kann man davon ausgehen, dass die Osmolalität des Medium nicht direkt limitierend auf das Überleben der Mutanten sein kann. In diesem Zusammenhang konnte durch Stresstoleranztests gegenüber osmotisch wirksamen Substanzen wie NaCl, Sorbitol, KCl und $MnCl_2$ ebenfalls kein phänotypischer Einfluss auf die Mutanten festgestellt werden (vgl. Abschnitt 4.2.6 Abbildung 17/18). Man kann dennoch spekulieren, dass eine geringere Osmolalität des Mediums mit einer erhöhten Nährstoffaufnahme durch die Mutanten korrelieren könnte, wonach die Doppelmutante $\Delta vhr1/\Delta nqm1$ durch eine bessere Nährstoffakquise einen Überlebensvorteil im chronologischen Alterungsexperiment gehabt hätte.

Obwohl unter den getesteten Deletionsmutanten keine auffälligen Resistenz- bzw. Sensibilitätsphänotypen gegenüber osmotisch wirksamen Substanzen identifiziert werden konnten, wurde trotz dessen, aufgrund bestimmter Assoziationen die Expression von *NQM1* bei Kontakt mit NaCl und Sorbitol untersucht. Die Fähigkeit

der Osmotoleranz wurde bereits zuvor mit einer erhöhten Überlebensfähigkeit in Verbindung gebracht [70]. In einer Studie zur Untersuchung der zellulären Antwort auf osmotischen Stress wurde demonstriert, dass die Hauptstoffwechselroute, der durch Osmose kontrollierten Genexpression, über die Gene *HOG1-HOT1* vermittelt wird, und dass diese ebenfalls die Expression von *NQM1* beeinflussen können [124]. Mit Northern Blot - Analysen wurde dabei für den Wildtyp demonstriert, dass *NQM1* bei hohen NaCl-Konzentrationen induziert wird und dass die Expression von *NQM1* durch eine Deletion von *HOG1* über 75% reduziert wurde [124].

In der Tat konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass die Expression von *NQM1* unter NaCl- und Sorbitolstress induziert werden kann (vgl. Abschnitt 4.2.6 Abbildung 19). Die Induktion war dabei sehr stark und erreichte Werte von bis zu 750-fach erhöhten mRNA Leveln. Für die *VHR1* - Deletion zeigte sich bei NaCl-Stress, dass die Induktion von *NQM1* relativ unabhängig von *VHR1* war. Bei Sorbitolstress zeigte sich nach einer Deletion von *VHR1* eine ebenfalls stark reduzierte Expression von *NQM1* (analog zu den Phänotypen unter verschiedenen Kohlenstoffquellen und Kalorierestriktion).

Die zelluläre Antwort auf osmotische Störungen in Eukaryoten wird hauptsächlich über den MAP [engl.: mitogen activated protein] Kinase - Signalweg vermittelt [197]. Der am besten charakterisierte Signalweg für Hefe ist in dem Zusammenhang der *HOG* [engl.: high osmolarity glycerol] - Signalweg [198]. Dabei werden die initialen Signale über eine serielle MAP Kinasekaskade (MAPK) vermittelt und führen letztlich zu einer Translokation der MAPK Hog1p in Richtung des Zellkerns. Neben Hog1p wurde kürzlich auch Hot1p als Teil des *HOG* - Signalweges identifiziert [199]. Für *NQM1* wurde bereits gezeigt, dass *HOG1-HOT1* die Induktion von *NQM1* unter osmotischen Stress beeinflussen [124]. Eine weitere Erkenntnis dieser Studie war, dass viele der im Normalzustand schwach exprimierten Isoformen wie bspw. *NQM1* und *GND2* spezifisch unter osmotischem Stress induziert werden, wobei gleichzeitig die Aktivität der Hauptisoformen reduziert wurde [124]. Die zelluläre Antwort, die zur Abwehr von osmotischen Stress über Hog1p vermittelt wird, wurde zusätzlich mit der Regulation der Lebensspanne in Verbindung gebracht, indem sie die Produktion von Glycerol über glykolytische Intermediate anregt [70]. Glycerol gilt unter anderem als Speicherstoff, welcher gleichzeitig osmo-protective Eigenschaften aufweist [200]. Es wurde vermutet, dass die lebensverlängernden Effekte von Glycerol durch kombinierte Effekte von Kalorierestriktion und der Aktivierung

von osmosensitiven Signalwegen über Hog1p vermittelt werden, welches nachfolgend bspw. die mit der Regulation des Alterns in Verbindung stehenden Sirtuine beeinflusst [70]. Da Nqm1p als Transaldolase an der Bildung des glykolytischen Metaboliten G3P beteiligt ist, welches im nächsten Schritt durch die Triosephosphatisomerase zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) isomerisiert werden kann, kann spekuliert werden, dass der Langzeitüberlebensvorteil von *NQM1* - Deletionen mit der Produktion von Glycerol in Verbindung steht. Das glykolytische Metabolitprofil ergab für die haploiden *VHR1*-, *NQM1* Einzel- bzw. Doppelmутanten erhöhte Konzentrationen G3P, jedoch zeigten sich keine erhöhten DHAP-Konzentrationen, sodass der Nachweis der Glycerolakkumulation auf weiterführende Studien vertagt werden muss und hier vorerst nur spekulativ verbleibt. Über die detaillierte transkriptionelle Regulation von *NQM1* ist bisher nur sehr wenig bekannt. Jedoch zeigen Analysen des *NQM1* - Locus potentielle Bindungsstellen für die generellen stressinduzierten Transkriptionsfaktoren Msn2/4p (Yeasttract Datenbank). Diese Faktoren wurden ebenfalls als transkriptionelle Regulatoren der *HOG1* - abhängigen zellulären Antwort auf osmotischen Stress diskutiert [201–203] und repräsentieren daher eine mögliche Verbindung von *NQM1* zu bisher bekannten regulativen Signalwegen der zellulären Antwort auf osmotischen Stress, welche die erhöhte Überlebensfähigkeit bei vorliegender Heterozygotie von *NQM1* und *VHR1* erklären könnten.

5.2 Analyse von Glycolyse-/ PPP-Stoffwechselmutanten

5.2.1 Glycolyse- und PPP-Mutanten zeigen charakteristisches Wachstumsverhalten

Bei ausreichender Nährstoffverfügbarkeit lässt sich das Wachstumsverhalten von Hefe auf Glucose klassisch in vier Phasen unterteilen. Die anfängliche Start bzw. Verzögerungsphase (lag-Phase), in der sich der Stoffwechsel auf primär fermentative Prozesse (Glycolyse) einstellt und demnach alle nachfolgenden, für den Glucosekatabolismus, erforderlichen Enzyme aktiviert wird gefolgt von der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase). Die exponentielle Wachstumsphase ist charakterisiert durch einen fermentativen Umsatz von Glucose zu Ethanol, der auch bei ausreichen-

der Sauerstoffversorgung erfolgt (Crabtree-Effekt) und weist zusätzlich eine hohe Biomassezuwachsrate auf [203]. Die dafür notwendige Energie in Form von ATP bzw. die erforderlichen Vorläufer zur Biosynthese von Nukleotiden (DNA/RNA) und Coenzymen (NAD, FAD, CoA) werden dabei über die Stoffwechselwege Glycolyse und PPP bereitgestellt. Sobald Glucose vollständig metabolisiert wurde, vollziehen die Zellen den Diauxic shift. Dieser ist durch eine Umstellung des Metabolismus auf Respiration und Gluconeogenese gekennzeichnet. Zeitgleich treten dabei eine Reduzierung der Wachstumsrate sowie die Aktivierung des Citratzyklus und der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien auf [204, 205], was in der Oxidation der akkumulierten Fermentationsprodukte und einem hohen Energiegewinn in Form von ATP resultiert. Eine Umstellung der fermentativen Umsetzung von Glucose zu Ethanol sowie die nachfolgende oxidative Respiration von Ethanol zu Kohlenstoffdioxid erfordern zudem umfangreiche Umstellungen im Zellstoffwechsel, die sowohl auf transkriptioneller als auch metabolischer Ebene erkennbar sind [206–210]. Beispielsweise werden dabei viele der zuvor durch Glucose reprimierten Gene aktiviert [206]. Zusätzlich bedingt eine höhere Respiration gleichzeitig die Ausbildung von Abwehrmechanismen gegenüber ROS, welche typische Begleiterscheinungen der Respiration sind [5, 6, 8]. Sobald der aus Glucose entstandene Ethanol ebenfalls verbraucht ist, treten die Zellen in die vierte und letzte Wachstumsphase (stationäre Phase) ein. Diese Phase ist gekennzeichnet durch Wachstumsstillstand bei gleichzeitigem Zellteilungsstillstand sowie der Akkumulation von Kohlenhydratspeicherstoffen [211], Autophagie [212] und einer generell gesteigerten Resistenz gegenüber Hitze-, osmo- sowie oxidativen Stress [213].

Im Zuge der Charakterisierung von Glycolyse-/ PPP-Mutanten wurden zunächst Wachstumsprofile aller prototrophen Mutanten aus Glycolyse und PPP aufgezeichnet. Dabei zeigten sich für den Großteil der Glykolyse- als auch der PPP-Mutanten die typischen Wachstumsphasen mit lag-, log- und stationärer Phase. Das exponentielle Wachstum war am stärksten unter Glucose (fermentative Umsetzung von Glucose). Unter Galactose zeigte sich eine etwas abgeschwächte exponentielle Phase (geringere Steigung), was in dem gleichzeitigen Abbau der Glucose über den fermentativen sowie respirativen Weg begründet ist [214]. Unter Ethanol ergab sich allgemein die geringste Steigung innerhalb der exponentiellen Phase sowie die, im Vergleich zu Glucose/Galactose, niedrigste maximale Populationsdichte, was sich durch den

respirativen Abbau von Ethanol zu Kohlenstoffdioxid bei gleichzeitig erhöhter Aktivität der Gluconeogenese begründen lässt.

Für die Glykolysemutanten war besonders bei der Mutante $\Delta pgm2$ eine Auffälligkeit beim Wachstumsverhalten zu erkennen (vgl. Abschnitt 4.3.1 Abbildung 30 und Tabelle 20). Die $\Delta pgm2$ - Mutante zeigte unter dem Einfluss von Galactose ein signifikant verringertes Wachstum ($p < 0.001$). *PGM2* katalysiert die reversible Umsetzung von Glucose-1-phosphat zu Glucose-6-phosphat (G6P) und erfüllt ca. 80-90% der zellulären Gesamtaktivität der Phosphoglucomutase. In der Literatur finden sich zudem Hinweise, dass die Expression von *PGM2* unter anderem durch Galactose sowie durch diverse Stress auslösende Substanzen wie bspw. Ethanol, Salz und bei Glucoselimitierung induziert wird [215–220]. Deletionen in *PGM2* zeigen eine Akkumulation von Glucose-1-phosphat und intrazellulären Ca^{2+} [221]. Das minimale Wachstum unter Galactose wird bei $\Delta pgm2$ - Mutanten auf die Aktivität von *PGM1* zurückgeführt, da $\Delta pgm1/\Delta pgm2$ - Doppelmutanten, obwohl lebensfähig, Galactose nicht metabolisieren können [222]. In diesem Fall kann zusätzlich davon ausgegangen werden, dass die Viabilität, neben der Aktivität von *PGM1*, eventuell durch das Isozym *PGM3* gewährleistet wird. *PGM3* ist in seiner Hauptfunktion eine Phosphoribomutase, welche die Umsetzung von Ribose-1-phosphat zu Ribose-5-phosphat katalysiert [223]. Diese Aktivität wurde ebenfalls für *PGM1* und *PGM3* berichtet und zudem konnte in diesem Zusammenhang die katalytische Aktivität von *PGM3* am Substrat Glucose-1-phosphat nachgewiesen werden [223]. Jedoch zeigt sich im Fall von Galactose deutlich, dass die Aktivitäten von *PGM1* und *PGM3* offensichtlich nicht ausreichen, um den Ausfall von *PGM2* vollständig zu kompensieren. Generell deuten diese Ergebnisse auf eine essentielle Funktion von *PGM2* im respirativen Metabolismus hin. Des Weiteren zeigte sich bei der Mutante $\Delta pfk1$ unter Glucose, Galactose und Ethanol ein signifikant verringertes Wachstum (vgl. Abschnitt 4.3.1 Tabelle 20; Glucose/Galactose $p < 0.001$, Ethanol $p < 0.05$). *PFK1* codiert für eines der wichtigsten regulatorischen Kontrollenzyme der Glykolyse, die Phosphofruktokinase 1. Sie katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der irreversiblen ATP-abhängigen Umwandlung von Fructose-6-phosphat (F6P) zu Fructose-1,6-Bisphosphat (F1,6BP) und ist somit in der Lage den Flux der Glykolyse zu kontrollieren. Die Regulation der Pfk1p erfolgt allosterisch, wobei ATP und Citrat sowie das Produkt der Enzymreaktion F1,6BP inhibitorisch und im Gegensatz dazu AMP und der Metabolit Fructose-2,6-Bisphosphat (F2,6BP)

aktivierend wirken [224]. Unter Glucose erfolgt zudem eine gesteigerte Induktion von *PFK1* sowie *PFK2* [225], sodass Phosphofruktokinasen als regulatorischer Schalter zwischen der Glykolyse und der Gluconeogenese fungieren. Die zentrale Bedeutung von *PFK1* wird zudem aufgrund der Tatsache ersichtlich, dass Deletionen von *PFK1* in einem verringerten Wachstum unter fermentierbaren Zuckerquellen, bei zusätzlich auftretenden Akkumulationen der vorgeschalteten Metaboliten Glucose-6-phosphat (G6P) und F6P sowie Sedoheptulose-7-phosphat (S7P), resultieren [226,227]. Die enzymatische Katalyse wird bei vorliegender *PFK1* - Deletion von *PFK2* übernommen. *PFK1* und *PFK2* codieren für die α und β - Untereinheiten des hetero-oligomeren Enzymkomplexes Phosphofruktokinase, bestehend aus vier α/β -Untereinheiten, welche als vier α/β -Heterodimere arrangiert sind [228]. Neben den Mutanten $\Delta pgm2$ und $\Delta pfk1$ zeigte die Deletionsmutante $\Delta pyc1$ ebenfalls besonders auffällige Wachstumsraten unter Glucose und Ethanol. *PYC1* codiert für das Enzym Pyruvatcarboxylase, welches die Umsetzung von Pyruvat zu Oxalacetat (OxAc) katalysiert. Das Enzym ist einerseits während der Gluconeogenese von Bedeutung, da sie im ersten Schritt die irreversible Pyruvatkinasereaktion umgeht und zur Generierung von OxAc beiträgt, welches nachfolgend durch die Pyruvatcarboxykinase zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt wird. *PYC1* hat zudem auch im Normalzustand (fermentativer Metabolismus) eine anaplerotische Funktion in der Bildung von OxAc und dient damit der Zulieferung und Regenerierung des OxAc-Pools für den Citratzyklus. Rund 70% des zellulären OxAc entstehen durch die Reaktion der Pyruvatcarboxylase [229]. Deletionen von *PYC1* führen zu retardiertem Wachstum unter Glucose und besonders unter Ethanol, wodurch deutlich wird, dass die Expression von *PYC1* zum Wachstum essentiell ist [230]. Der Ausfall von *PYC1* kann zwar durch ihr Paralog *PYC2* kompensiert werden, jedoch ist die Aktivität von *PYC2* zumeist auf die frühe log-Phase beschränkt (sie wird später reprimiert und normalerweise durch eine höhere *PYC1* - Expression kompensiert) [230], sodass dies zu einem, im Vergleich zur vollen Funktionalität von *PYC1*, geringerem Wachstum führt (vgl. Abschnitt 4.3.1 Tabelle 20). Umgekehrt resultiert eine Deletion von *PYC2* in keinem sichtbaren Phänotyp und einem zum Wildtyp vergleichbaren Wachstum (vgl. Abschnitt 4.3.1 Tabelle 20). Letztlich muss noch angemerkt werden, dass der Glyoxalatzyklus bei funktioneller *PYC1* nur minimale Aktivität zeigt [230]. Bei allen anderen Glycolysemutanten zeigte sich

ein, dem Wildtyp sehr ähnliches, Wachstumsverhalten unter den drei getesteten Kohlenstoffquellen mit einer durchschnittlichen maximalen Abweichung von $\sim 10\%$. Bezüglich der PPP-Mutanten bzw. dessen topologisch assoziierter Mutanten zeigte sich größtenteils ein wildtypähnliches Wachstumsverhalten (Abweichungen max. 5%). Bei den Mutanten $\Delta gnd1$, $\Delta tkl1$, $\Delta rpe1$, $\Delta prs3$ und $\Delta zwf1$ konnten jedoch einige Wachstumsanomalien beobachtet werden (vgl. Abschnitt 4.3.1 Abbildung 31 und Tabelle 21).

GND1 codiert für eine Phosphogluconatdehydrogenase und ist ein essentieller Bestandteil des oxidativen PPP. *GND1* ist beteiligt an der zweiten oxidativen Reduktion von NADP^+ zu NADPH. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich *GND1* - Deletionen unter Glucose negativ auf das Wachstumsverhalten auswirken und dabei eine Art Seneszenz, speziell bei Tumorzellen, verursachen, was auf die Akkumulation der Metaboliten 6-Phospho-D-Gluconat und D-Glucono- δ -lacton-6-Phosphat und die damit verbundenen Umverteilungen des metabolischen Fluxes zurückzuführen ist [231]. Dabei wird vermutet, dass die Zellen durch die *GND1* - Deletion trotz dessen versuchen ihre Level an NADPH und NTPs durch eine Neuverteilung der Überschneidungen von Glycolyse, PPP und Glutaminolyse (eine weitere Quelle zur NADPH-Synthese) konstant zu halten [231]. Da diese Änderungen in den metabolischen Stoffwechselwegen sehr drastisch sind, wird vermutet, dass die Zellen auf bisher ungeklärte Weise in der Folge Glucose als Wachstumsinhibitor wahrnehmen [231], was im beobachteten Wachstumsverhalten resultiert.

Die natürliche Funktion der Transketolase 1 (codiert von *TKL1*) besteht in der reversiblen Umsetzung von Xylulose-5-phosphat (X5P) und Ribose-5-phosphat (R5P) zu S7P und Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P). Zusammen mit den Transaldolasen (*TAL1*, *NQM1*) bilden die Transketolasen (*TKL1*, *TKL2*) eine reversible Verbindung zwischen den zwei Hauptwegen des Kohlenhydratstoffwechsels (Glycolyse/PPP), welche der Zelle erlauben ihre NADPH- und R5P-Produktion den erforderlichen Bedürfnissen anzupassen [232]. *TKL1* - Mutanten zeigen in der Regel ein normales Wachstumsverhalten auf komplexen Vollmedium, jedoch in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds Wachstumsdefizite auf Minimalmedium [233–235]. *TKL1* wird für die effiziente Nutzung fermentierbarer Kohlenstoffquellen und zur Synthese der aromatischen Aminosäuren benötigt [234]. Eine Überexpression bzw. Deletion von *TKL1* resultiert in einem Wachstumsdefizit auf fermentierbaren (Glucose, Raffinose) sowie gluconeogenetischen Kohlenstoffquellen (Pyruvat, Ethanol, Glycerol) und ver-

deutlich dadurch, dass eine angemessene Balance zwischen Glycolyse und PPP zur effizienten Nutzung fermentierbarer Kohlenstoffquellen von essentieller Bedeutung ist [234]. Dieser Phänotyp konnte in diesem Fall ebenfalls bestätigt werden.

RPE1 codiert für das Enzym Ribulose-5-phosphatpimerase 1 und katalysiert die Umsetzung von R5P zu X5P. Die signifikant reduzierte Wachstumsrate ($p < 0.01$) der $\Delta rpe1$ - Mutante unter Galactose könnte in der Ursache auf verminderte Level von NADPH zurückzuführen sein, wodurch allgemein die Biosynthese beeinträchtigt wird [234]. Gleiches betrifft die Mutante $\Delta zwf1$. *ZWF1* codiert für das Enzym Glucose-6-phosphatdehydrogenase, das erste Enzym des oxidativen PPP, welches G6P unter NADPH-Gewinn zu 6-Phospho-D-Gluconat umsetzt. *ZWF1* ist in seiner Funktion wichtig zur Abwehr von oxidativen Stress, was u.a. an der erhöhten Sensitivität der $\Delta zwf1$ - Mutante gegenüber H_2O_2 deutlich wird [8]. Deletionen von *ZWF1* verhindern damit den Flux entlang des oxidativen PPP und blockieren dadurch eine Route zur NADPH-Synthese, womit dieser wichtige Cofaktor bei der Biosynthese limitierend wird. Generell zeigen PPP-Mutanten häufiger Fitnessdefekte, was auf einen NADPH-Mangel zurückgeführt wird [25].

In *S. cerevisiae* wird der Metabolit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP), welchen unter anderem an der Synthese von Purinen, Pyrimidinen, Tryptophan und Histidin beteiligt ist, durch die Genprodukte von *PRS2*, *PRS3*, *PRS4*, *PRS5* synthetisiert. Die genaue Funktion von *PRS3* ist noch nicht aufgeklärt, es wird jedoch vermutet, dass aufgrund der veränderten Wachstumsraten und Enzymaktivitäten besonders *PRS1* und *PRS3* einen starken Einfluss auf den zellulären Metabolismus ausüben [236]. Offenbar wirkt sich eine Deletion von *PRS3* bei gleichzeitiger Deletion von *PRS5* auf die Viabilität der Mutanten aus. Doppeldeletionen von *PRS1* und *PRS5* bzw. *PRS3* und *PRS5* sind letal, wodurch erkennbar wird, dass *PRS3* neben *PRS1* und *PRS5* essentielle Funktionen zur Aufrechterhaltung der Viabilität innerhalb der Zelle erfüllen [237]. Hinweise deuten darauf hin, dass *PRS3* im Kontext mit *PRS1* zur Aufrechterhaltung der zellulären Integrität notwendig sind. Dabei sind die beiden Proteine offensichtlich an der Synthese der Zellwand beteiligt, da sich deren Deletionen in erhöhten Chitinkonzentrationen äußern [238]. Zudem wurde bei Untersuchungen von Stoffen bzw. Mutationen, welche mit der Zellwandsynthese interferieren, eine Anreicherung von Genen gefunden, dessen Produkte zum einen an der Energieproduktion und zum anderen am Metabolismus beteiligt sind [239, 240]. Die *PRS* - Gene wurden ebenfalls dahingehend kategorisiert, da sie zur Synthese

von PRPP notwendig und somit auch an der Nukleotidsynthese beteiligt sind [238]. Beispielsweise tragen sie zur Bildung von Uridintriphosphat (UTP) bei, welches u.a. während der Chitinsynthese an der Herstellung von UDP-N-Acetylglucosamin beteiligt ist [238]. In *PRS* - Mehrfachmutanten konnten bereits stark reduzierte Konzentrationen an UTP, UDP, UMP nachgewiesen werden, sodass man davon ausgeht, dass die reduzierten Nukleotidlevel eventuell die Ursache von Zellwandschäden sein könnten [238]. Der genaue Zusammenhang zum respirativen Stoffwechsel unter Galactose ist dabei noch nicht geklärt. Somit kann über die beobachtete Wachstumsstörung unter Galactose nur vermutet werden, dass es sich dabei um Nebeneffekte der gestörten Zellwandsynthese handeln könnte.

5.2.2 Kombinierte genetische und umweltbedingte Perturbationen beeinflussen die Verteilung proteinogener Aminosäuren

Über die Effekte von Stoffwechsellzyndeletionen aus Glycolyse und PPP bezüglich der Ebene der Aminosäuren ist bisher wenig bekannt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, den Einfluss von kombinierten genetischen und umweltbedingten Störungen auf die intrazellulären Konzentrationen der freien, proteinogenen Aminosäuren zu verdeutlichen. Dazu wurden Deletionsmutanten aus den beiden Stoffwechselwegen Glycolyse und PPP systematisch auf die Verteilung ihrer intrazellulären Aminosäuren hin untersucht.

An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass sich die Interpretation der zuvor gezeigten Ergebnisse, bezüglich der Aminosäureverteilungsprofile von Glycolyse-/PPP-Mutanten, aufgrund verschiedener Aspekte als relativ schwierig erweist. Die Gründe dafür liegen u.a. an der relativ weiten Distanz der regulativen Ebenen von Genom und Aminosäuren. Die Auswirkungen von Deletionen in glykolytischen bzw. PPP-assoziierten Genen, speziell auf die Ebene der Metaboliten und Aminosäuren, sind bisher nicht vollständig systematisch analysiert worden. Einzelne Studien zeigten bereits, dass die Auswirkungen von umweltbedingten Störungen einen globaleren Effekt auf die Metabolitenverteilung haben und dass dieser im Allgemeinen stärker ist als selektive Deletionen einzelner Enzyme des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels, welche hauptsächlich in lokalen Konzentrationsveränderungen in topologischer Nähe der untersuchten Deletionen resultierten [103]. In diesem Zusammenhang

wurde ebenfalls festgestellt, dass die Schlüsselmetaboliten zur Biosynthese von bspw. Aminosäuren in ihrer Konzentration wohl weitestgehend konstant unter den getesteten Perturbationen waren. Aufgrund der Tatsache, dass die Aminosäuren metabolische Vorläufer besitzen, könnte eine ähnliche Konstanz in der Ebene der Aminosäuren zu erwarten sein. Jedoch können allein durch die spezifischen Aminosäurebiosynthesegene sowie der dabei auftretenden Interkonnektion zu anderen Biosynthesewegen (bspw. Shikimatweg/ Folatsynthese) zahlreiche weitere regulative Möglichkeiten der Auswirkung von umweltbedingten und genetische Störungen ergeben, sodass die Konstanz der Aminosäurelevel dadurch beeinträchtigt werden könnten. Zudem können feine Unterschiede in der Nährstoffverfügbarkeit drastische Auswirkungen auf die Biosynthese und Degradation zahlreicher Stoffwechselintermediate haben und sich daher auch auf die Ebene der Aminosäuren auswirken [16, 241]. So registriert bspw. der Transkriptionsfaktor Leu3p die intrazellulären Leucinkonzentrationen in Abhängigkeit des Intermediats α -Isopropylmalat und aktiviert daraufhin die Leucinbiosynthese [242]. Umgekehrt verhält sich Put3p, welcher die Prolindegradation in Abhängigkeit der Prolinlevel aktiviert [243]. Für die zahlreichen Gene der Glycolyse und des PPP sind aktuell kaum regulatorische Effekte bezüglich der Ebene der Aminosäuren bekannt. Mögliche regulatorische Überschneidungen von Glycolyse bzw. PPP mit der Ebene der Aminosäuren könnten dabei potentiell über diverse Signalwege erfolgen. Unter Aminosäuremangelbedingungen wird bspw. der generelle Aminosäurekontrollweg (GAAC) aktiviert, um die Beeinträchtigung der Translation gering zu halten, da Aminosäuremangel zur Akkumulation von unbeladenen t-RNAs führt [244]. Bei der Reaktion auf Aminosäuremangel gilt der Transkriptionsfaktor Gcn4p als besonders wichtig. *GCN4* induziert daraufhin eine Vielzahl von Genen in diversen Biosynthesewegen [244], wobei *GCN4* dabei auch durch Metaboliten anderen Aminosäurebiosynthesewege bspw. von β -Aspartatsemialdehyd aus der Threoninsynthese spezifisch bei Isoleucin- und Valinmangel, reguliert werden kann [245]. Zwischen dem generellen Aminosäurekontrollweg und der nährstoffsensitiven Tor-Kinase bestehen ebenfalls regulatorische Beziehungen, da *GCN4* zusätzlich als transkriptioneller Effektor des Tor-Signalwegs identifiziert wurde und sich damit sehr ähnliche transkriptionelle Regulationsprogramme zwischen GAAC und dem Tor-Signalweg ergeben. Das betrifft neben der Induktion der Aminosäurebiosynthese, des Intermediärstoffwechsels und diverser Transportprozesse zusätzlich, analog zum Tor-Signalweg, zahlreiche Gene des Stickstoffstoffwechsels [21]. Tor-Signale regulie-

ren vor allem das Zellwachstum und die Proliferation und kontrollieren verschiedene Aspekte des zellulären Metabolismus durch Induktion der Expression metabolischer Gene (z.B. Glucose-6-phosphatdehydrogenase vermittelt über HIF1 [engl.: hypoxia inducible factor 1] und SREBP [engl.: sterol regulatory element-binding protein] [246]. In dem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung des humanen Tor-Homologs mTORC1 ausreicht, um den Flux durch die Glycolyse und den PPP zu vermitteln [246]. Zusätzlich wurde demonstriert, dass das glykolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) über eine Interaktion mit Rheb Signale an mTOR übertragen kann und als Reporter des glykolytischen Fluxes dient [247]. Eine Aktivierung des TOR-Signalwegs kann zudem direkt über Aminosäuren erfolgen, was u.a. für Glutamin belegt ist [248]. Letztlich muss auch darauf hingewiesen werden, dass viele der Aminosäurebiosynthesreaktionen zudem häufig von verschiedenen Cofaktoren abhängig sind (ATP, NADH, NADPH), wobei diese entweder verbraucht oder gebildet werden, sodass sich Störungen in den Konzentrationen der Cofaktoren drastisch auf die Biosynthese von Aminosäuren auswirken können. Unter anderem wurden für glykolytische Deletionen unter dem Einfluss von Glucose allgemein verringerte ATP-Level beschrieben [249]. Daneben sei erwähnt, dass einige Aminosäuren häufig als Aminogruppendonor wirken (Glutamat, Glutamin, Alanin, Serin), sodass deren intrazellulären Konzentrationen ebenfalls sehr variabel sein können. Anhand dieser Beispiele wird deutlich, dass die Regulation des Aminosäurepools durch viele Faktoren beeinflusst werden kann und dass individuelle Effekte von Deletionen innerhalb eines Stoffwechselwegs, aufgrund der Komplexität der Mechanismen nur sehr schwer direkt mit den beobachteten Störungen des Aminosäurestoffwechsels korreliert werden können. Zur vollständigen Interpretation der Aminosäureverteilungsprofile sind weitere systematische Analysen bspw. des Transkriptoms, Proteoms, Metaboloms, Fluxoms der zu untersuchenden Deletionsmutanten unter den getesteten Bedingungen erforderlich, da sich metabolische Unterschiede aufgrund epistatischer Effekte auf weit mehr regulatorische Ebenen auswirken können ([250]; unveröffentlichte Ergebnisse, zur Zeit im Review). Die hier beschriebenen systematischen Studien geben daher einen ersten Eindruck der Effekte von Deletionen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels auf die Ebene der Aminosäuren wieder und können zukünftig für weitere Analysen wie bspw. für *in silico* - Modelle als Grundlage verwendet werden. Weiterhin können die hier aufgeführten Aminosäureverteilungsprofile zur Identifikation potentieller Regula-

toren des intrazellulären Aminosäurepools genutzt werden und zudem aufzeigen, inwiefern Deletionen von Genen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels generell die Ebene der Aminosäuren beeinflussen und weisen damit ein hohes diagnostisches und biotechnologisches Potential auf.

5.2.2.1 Unterschiedliche Kohlenstoffquellen erzeugen charakteristische Aminosäureprofile

Anhand der zuvor beschriebenen Ergebnisse konnte der Einfluss der verschiedenen Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose und Ethanol auf die Aminosäureverteilung demonstriert werden (vgl. Abschnitt 4.3.3.1 Abbildung 51). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Profile unter Glucose und Galactose, über die Gesamtheit der Mutanten betrachtet, prinzipiell eine höhere Ähnlichkeit zueinander aufweisen, als im Vergleich zu den Ethanolprofilen. Die generelle Ähnlichkeit der Profile unter Glucose/Galactose ist insofern durchaus zu erwarten, da unter Glucose und Galactose der katabolische Abbau der Kohlenhydrate in beiden Fällen über die Glycolyse vermittelt wird. Sobald Glucose als primäre Energiequelle in ausreichender Menge zur Verfügung steht, erfolgt deren Abbau in *S. cerevisiae* strikt fermentativ. Ist Galactose verfügbar, so erfolgt zusätzlich eine Aktivierung des Citratzyklus sowie der oxidativen Phosphorylierung, wodurch Galactose respirativ umgesetzt wird. Ethanol wird ebenfalls respirativ umgesetzt und gelangt nach einer NADH-abhängigen Oxidation zu Acetaldehyd und nachfolgender Bindung von Coenzym A als aktiviertes Coenzym A in den Citratzyklus. Daneben wird unter dem Einfluss von Ethanol die Gluconeogenese aktiviert, die zum Aufbau von Glucose die Glycolyse in umgekehrter Richtung durchläuft. Aus diesen Gründen ist ersichtlich, dass sich die Aminosäureverteilungsprofile zwischen Glucose/Galactose mehr Ähnlichkeiten aufweisen, da der Katabolismus über die Glycolyse in Richtung Glucose-6-phosphat zu Pyruvat vermittelt wird. Ethanol verursacht dagegen einen retrograden Flux durch die Glycolyse und zeigt damit ein zu erwartendes, stärker abweichendes und in Teilen inverses Aminosäureverteilungsprofil, da die Umstellungen im Stoffwechsel umfassender sind als bei Glucose und Galactose.

Der Vergleich der Profile zwischen Glucose, Galactose und Ethanol für beide Mutantensets (Glycolyse/PPP) anhand der Z-Transformation ergab zudem, dass sich die Aminosäurekonzentrationen der Mutanten für die jeweilige Kohlenstoffquelle weitest-

gehend an der Konzentrationsverteilung des dazugehörigen Wildtyps orientierten. Nur unter dem Einfluss von Ethanol traten für einzelne Mutanten deutliche Abweichungen zum korrespondierenden Wildtyp auf (vgl. Abschnitt 4.3.3.1 Abbildung 51). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Kohlenstoffquellen zu spezifischen und charakteristischen Konzentrationsverteilungen der Mutanten führten, was im Konsens zu vorangegangenen Studien steht [103] und dass diese relativ unabhängig vom Mutantenset waren. Sowohl für die glykolytischen als auch die PPP-Mutanten zeigten sich dabei besonders unter Glucose erhöhte Konzentrationen für die Aminosäuren Serin, Threonin, Glycin und Lysin; unter Galactose für Tryptophan, Tyrosin und Prolin sowie unter Ethanol für Alanin, Asparagin und Glutamin. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Theorie des erhöhten glykolytischen Fluxes unter Glucose, wodurch der Metabolit 3-Phosphoglycerat entstehen kann, welcher wiederum Ausgangspunkt zur Bildung von Serin und Glycin ist. Pyruvat wird nachfolgend zu Oxalacetat umgesetzt, was die erhöhten Konzentrationen an Threonin und Lysin erklären könnte, da sie aus diesem Metabolit hervorgehen. Da Galactose zudem respirativ metabolisiert wird und eine erhöhte Respiration die Aktivität des PPP zur Abwehr oxidativer Schäden bedingt [5], erscheinen die höheren Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan insofern logisch. Da Ethanol über den Citrat- bzw. Glyoxalatzyklus metabolisiert wird, kann angenommen werden, dass die Metaboliten dieser Zyklen in erhöhten Konzentrationen vorliegen, sodass die daraus synthetisierten Aminosäuren teilweise durchaus ebenfalls diesen Anstieg aufzeigen können. Letztlich lässt sich generell ein retrograder bzw. inverser Konzentrationstrend für Ethanol im Vergleich zu Glucose/Galactose erkennen, der mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Kohlenhydratsynthese über den Weg der Gluconeogenese erklärbar ist.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Effekte der verschiedenen Zuckersubstrate prinzipiell über die Effekte genetischer Deletionen dominieren und es dadurch zur Ausbildung deutlich voneinander unterscheidbaren Aminosäurekonzentrationsverteilungen kommt.

5.2.2.2 Der intrazelluläre Aminosäurepool zeigt Stabilität gegenüber genetischen Perturbationen

Durch die Bestimmung der Aminosäureverteilungsprofile konnten Mutanten identifiziert werden, die je nach vorliegender Kohlenstoffquelle, mehr oder weniger Einfluss auf die generelle Aminosäureverteilung ausüben. In diesem Abschnitt sollen die wichtigsten Mutanten, welche den größten Einfluss auf den Aminosäurepool zeigten, zusammenfassend diskutiert werden.

Dazu können vorab bereits einige Aussagen über das generelle Verhalten der Mutanten bezüglich ihrer Aminosäureverteilung gemacht werden. Beispielsweise konnten allgemein sowohl für die Glycolyse- als auch für die PPP-Mutanten nachgewiesen werden, dass es zwar häufiger Abweichungen zum Profil des dazugehörigen Wildtyps gab, jedoch waren viele der beobachteten Unterschiede nicht signifikant verändert. Weiterhin wurde sehr deutlich, dass die Änderungen in der Regel nicht stärker als das 1.5-fache (\log_2) von der Konzentration des Wildtyps abwichen. Mit anderen Worten, die Abweichungen betrafen in Einzelfällen maximal das Vierfache des Wildtyplevels, sodass die meisten Änderungen somit als relativ marginal angesehen werden können, wodurch deutlich wird, dass der Aminosäurepool weitestgehend eine Konstanz bzw. eine Stabilität gegenüber genetischen Perturbationen im zentralen Kohlenhydratstoffwechsel aufweist. Dies deckt sich ebenfalls mit anderen Studien, welche diese Stabilität bereits anhand der Metabolitenverteilung sowie für einige Aminosäuren demonstriert bzw. vermutet haben [103]. Die Ursache für diese Konstanz der verschiedenen regulatorischen Ebenen wird in der Wirkung von speziellen regulatorischen Kreisläufen vermutet, welche über Rückkopplungseffekte im Einklang mit der Aktivierung bzw. Inaktivierung der Genexpression einhergeht, was bspw. anhand der Leucinbiosynthese gezeigt werden konnte [251]. Für einige Mutanten konnten dennoch besonders zahlreiche Aminosäureänderungen detektiert werden.

Glycolysemutanten

Für die Glycolysemutanten ergaben sich spezifisch für jede Kohlenstoffquelle Gruppen von Mutanten die besonders zahlreiche Veränderungen in ihrer Aminosäureverteilung aufwiesen. Das waren unter dem Einfluss von Glucose besonders die Mutanten $\Delta pyc1$, $\Delta gpm2$, $\Delta pyc2$, $\Delta pyk2$. Daran wurde deutlich, dass die Mutan-

ten mit den meisten Änderungen in den Aminosäurekonzentrationen besonders diejenigen Positionen im Stoffwechselweg Glycolyse betreffen, welche Ausgangspunkt zur Synthese von Aminosäuren sind. Über die Ursachen der beobachteten Aminosäureveränderungen kann in Einzelfällen spekuliert werden, jedoch lassen sich nicht für alle Änderungen detaillierte Gründe aufführen. Beispielsweise wurde für *GPM2* (Phosphoglucomutase; katalysiert Umwandlung von 3-Phosphoglycerat (3PG) zu 2-Phosphoglycerat(2PG)) berichtet, dass es sich vermutlich um ein nicht-funktionelles Paralog zu *GPM1* handelt und das Deletieren von einer *GPM2* keine Effekte auf die Metabolitenverteilung der Glycolyse ausüben [252], sodass eine zu erwartende Akkumulation von 3PG ausbleibt und somit für die erhöhte Glycinkonzentration der $\Delta gpm2$ - Mutante (vgl. Abschnitt 4.3.2.1 Abbildung 33) kein Zusammenhang zu 3PG besteht. Alternativ könnte Glycin daher aus Threonin hervorgehen (vgl. Abschnitt 1.2 Tabelle 1), welches ebenfalls erhöht war.

Die zahlreichsten Veränderungen wurden für die $\Delta pyc1$ - Mutante festgestellt. *PYC1* codiert für die Pyruvatcarboxylase, welche die Umsetzung von Pyruvat zu Oxalacetat katalysiert. Sie ist einerseits während der Gluconeogenese von Bedeutung, da sie im ersten Schritt die irreversible Pyruvatkinasereaktion umgeht und zur Generierung von Oxalacetat beiträgt, welches nachfolgend durch die Pyruvatcarboxykinase zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt wird. *PYC1* hat zudem auch im Normalzustand eine anaplerotische Funktion in der Bildung von Oxalacetat und dient damit der Zulieferung und Regenerierung Oxalacetatpools des Citratzyklus. Das Aminosäureprofil der $\Delta pyc1$ - Mutante weist aufgrund der Brückenfunktion von *PYC1* zwischen Glycolyse und Citratzyklus starke positive und negative Änderungen in nahe jeder der 19 untersuchten Aminosäuren auf und zusätzlich zeigt die $\Delta pyc1$ - Mutante nahezu in jeder Aminosäure invertierte Konzentrationstrends zu den restlichen glykolytischen Mutanten. Ca. 70% des zellulären Oxalacetats entstehen durch die Reaktion der Pyruvatcarboxylase [229]. Eine Deletion von *PYC1* limitiert die Umsetzung von Pyruvat zu Oxalacetat, sodass die Synthese der oxalacetatogenen Aminosäuren theoretisch gestört werden müsste, wohingegen die pyruvatogenen Aminosäuren aufgrund der Akkumulation von Pyruvat in erhöhten Konzentrationen vorliegen müssten. In der Tat zeigte sich, dass die Konzentrationen der aus Oxalacetat hervorgehenden Aminosäuren Aspartat, Asparagin, Threonin, Lysin verringert waren, während von den pyruvatogenen Aminosäuren Alanin, Valin und Leucin erhöht waren (wobei nur Leucin signifikant erhöht war). Zudem zeigten sich

für die $\Delta pyc1$ - Mutante erhöhte Konzentrationen der aromatischen Aminosäuren, was womöglich mit erhöhten PEP-Leveln korreliert. PEP garantiert zusammen mit Erythrose-4-phosphat (E4P) die Bildung der aromatischen Aminosäuren. In anderen Studien zeigte sich bereits, dass der Wildtyp unter Glucose normalerweise konstante Level der aromatischen Aminosäuren aufweist und dass diese Level zudem von den natürlich auftretenden glykolytischen Oszillationen, welche u.a. für PEP auftreten, weitestgehend unbeeinflusst waren, was wahrscheinlich in der konstanten Versorgung mit E4P begründet liegt [253]. Die verringerten Serin- bzw. Glycinkonzentrationen könnten eventuell durch verringerte 3PG begründet sein oder durch verringerte Threoninkonzentrationen hervorgerufen werden, da Threonin auch zur Synthese von Glycin verwendet wird und Serin nachfolgend aus Glycin hervorgehen kann. Unter dem Einfluss von Glucose konnten für alle Glycolysemutanten die häufigsten positiven Änderungen (erhöhte Konzentrationen) für die Aminosäuren Glutamat, Asparagin, Alanin und Glycin (17-30% der Mutanten betroffen) beobachtet werden. Von negativen Änderungen (verringerte Konzentrationen) waren besonders Isoleucin, Valin und Leucin betroffen (15-25% der Mutanten) betroffen. Damit betreffen die Auswirkungen glykolytischer Deletionen besonders die Aminosäuren, welche aus den terminalen Positionen der Glycolyse (ausgehend von Pyruvat) sowie der Stoffwechselwege (Citratzyklus; ausgehend von Oxalacetat/ α -Ketoglutarat) hervorgehen.

Der Metabolismus von Galactose erfordert die Aktivierung von spezifischen Genen des Galactosekatabolismus (*GAL* - Gene), da Galactose nicht direkt über die Glycolyse metabolisiert werden kann, sondern zuvor in Glucose-6-phosphat (G6P) umgewandelt werden muss (vgl. Abschnitt 1.2 Abbildung 1). Unter Verwendung von Galactose als Kohlenstoffquelle zeigten die Glycolysemutanten tendenziell verringerte Aminosäurekonzentrationen (vgl. Abschnitt 4.3.2.2 Abbildung 39). Im Vergleich zu Glucose ergaben sich zudem weitaus weniger Veränderungen. Zu den am stärksten betroffenen Mutanten zählten $\Delta pyk2$, $\Delta fbp1$ und $\Delta pfk1$. Die Effekte einer *PYK2* - Deletion sollten im Allgemeinen, was das Aktivitätslevel bzw. dessen Metabolitenverteilung betrifft, relativ gering sein. *PYK2* ist normalerweise durch Glucose reprimiert und zeigt erst unter Ethanol ein erhöhtes Transkriptlevel und stellt zumindest unter fermentativen Bedingungen ein relativ inaktives Homolog zu Pyk1p (*CDC19*) dar [254]. Daher sind die beobachteten Veränderungen, wie schon bei Glucose, unerwartet und deren mechanistische Erklärung an dieser Stelle begrenzt.

Aufgrund einer nachgewiesenen höheren Expression von *PYK2* unter Ethanol sollten daher stärkere Effekte der Deletion unter Ethanol zu erwarten sein [254]. *FBP1* und *PFK1* codieren für die Enzyme Fructose-1,6-bisphosphatase sowie Phosphofruktokinase 1, wobei Fbp1p hauptsächlich unter gluconeogenetischen Bedingungen aktiv ist und dabei die Umkehrreaktion zur irreversiblen Pfk1p-Reaktion katalysiert. Zusätzlich stellen die beiden Enzyme wichtige regulatorische Positionen innerhalb der Glycolyse dar [224, 255, 256]. Durch das gemeinsame Substrat bzw. Produkt Fructose-1,6-Bisphosphat stellen sie zudem einen weiteren Regulator der Glycolyse bereit, der unter anderem an der Regulation des terminalen glykolytischen Enzyms Pyruvatkinase beteiligt ist und somit den Efflux der Glycolyse beeinflussen kann [257]. Da sich beide Enzyme in topologischer Nähe des Eintrittspunktes von Galactose (in Form von G6P) befinden, erscheint es durchaus logisch, dass bei Deletionen dieser Enzyme Störungen des Kohlenhydratfluxes auftreten. Der durch die Deletion von *PFK1* blockierte glykolytische Flux wird dabei womöglich durch eine Umleitung der Metaboliten G6P/F6P über den PPP umgangen, sodass die Metaboliten nach Durchlaufen des PPP in Form von G3P wieder zur Glycolyse rückgeführt werden können, was die erhöhten Level an Methionin, Isoleucin, Valin und Tryptophan erklären könnte. Interessanterweise treten für die $\Delta fbp1$ - Mutante, entsprechend ihrer gluconeogenetischen Funktion, welche anscheinend zu einem gewissen Prozentsatz unter Galactose ablaufen, genau für diese Aminosäuren inverse Konzentrationstrends auf. Zu den am stärksten veränderten Aminosäuren im Vergleich aller Mutanten zählten unter Galactose besonders Glycin, Alanin und Arginin. Isoleucin, Valin, Prolin zeigten häufig verringerte Konzentration, jedoch waren von diesen Änderungen maximal 10-25% der Mutanten betroffen, sodass sich für die Mutanten unter Galactose eine höhere Variabilität bezüglich der veränderten Aminosäuren zeigte.

Für die Glycolyseutanten unter dem Einfluss von Ethanol ergaben sich die häufigsten Störungen des Aminosäurepools für die Mutanten $\Delta pyc1$, $\Delta glk1$, $\Delta fbp1$ (vgl. Abschnitt 4.3.2.3 Abbildung 46). Speziell *PYC1* sowie *FBP1* wurden bereits zuvor als primär gluconeogenetische Gene beschrieben, die am Metabolismus nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen beteiligt sind. *GLK1* codiert für die Glucokinase 1 und katalysiert zusammen mit *HXK1* die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat [258]. Unter fermentativen Bedingungen sind diese beiden Enzyme reprimiert und die Phosphorylierungsreaktion von Glucose wird hauptsächlich

über *HXK2* vermittelt [258]. Damit betreffen die stärksten Aminosäureänderungen vor allem die zu erwartenden Positionen im Stoffwechsel, welche für das Wachstum unter nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wichtig sind. In diesen Mutanten wurden besonders verringerte Level der pyruvatogenen Aminosäuren beobachtet, was sich mit der Theorie deckt, dass ausgehend von Oxalacetat nach Umwandlung zu Pyruvat dieses ebenfalls weiter umgesetzt wird, sodass die Konzentrationen von Pyruvat vermutlich geringer sind, was sich zudem an den Konzentrationsspiegel der entsprechenden Aminosäuren zeigt. Für die Mutante $\Delta pyc1$ könnten die geringen Konzentrationen von Pyruvat in der Deletion begründet sein, da bei Ausfall der Pyruvatcarboxylase Oxalacetat nicht in Pyruvat umgesetzt werden kann und somit die erhöhten Level an Threonin und Lysin auch damit begründet werden könnten. Die Synthese von Pyruvat muss dabei dann auf anderem Wege gewährleistet werden. Beispielsweise könnte *PYC2* die Umsetzung von Oxalacetat zu Pyruvat bei Ausfall von *PYC1* katalysieren. Daneben existieren noch die Möglichkeiten der Transaminierung von Alanin (was die verringerten Level an Alanin erklären könnte) sowie die Synthese von Pyruvat ausgehend von Lactat mittels der NAD^+ -abhängigen Lactatdehydrogenase. Durch Aktivierung des Glyoxalatzyklus ergibt sich zudem eine weitere Möglichkeit der Glycinsynthese. Überraschenderweise zeigte die Mutante $\Delta pyk2$ entgegen der Erwartungen keine signifikant veränderten Aminosäuren unter Ethanol.

Insgesamt wurden unter Ethanol im Vergleich aller Mutanten die häufigsten Änderungen für Leucin und Alanin beobachtet.

Durch den Vergleich der spezifisch veränderten Aminosäuren der jeweiligen Mutante zwischen den drei Kohlenstoffquellen ergab sich, dass die meisten Änderungen sehr spezifisch für eine der drei Kohlenstoffquellen waren. Für einige Mutanten traten jedoch Gemeinsamkeiten bezüglich der betroffenen Aminosäuren auf (vgl. Abschnitt 4.3.3.2 Abbildung 52). Dabei zeigte sich, dass vor allem zwischen Glucose und Galactose die häufigsten Überschneidungen beobachtet werden konnten (in 8 von 20 Mutanten). Zwischen Glucose und Ethanol sowie zwischen Galactose und Ethanol gab es deutlich weniger Überschneidungen (3-4 von 20 Mutanten). Konstant veränderte Konzentrationen traten nur für die beiden Mutanten $\Delta pyc2$ (bei Alanin) und $\Delta fbp1$ (bei Leucin, Isoleucin, Methionin) auf, sodass man davon ausgehen kann, dass diese Gene eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Aminosäuren einnehmen. Auf welche Art und Weise diese Regulation erfolgt, kann an dieser Stelle nicht

abschließend beantwortet werden, da dafür zukünftig weitere Studien notwendig sind.

PPP-Mutanten

Für die PPP-Mutanten ergaben sich bezüglich der Aminosäureprofile unter dem Einfluss von Glucose besonders bei den Mutanten $\Delta prs2/3$, $\Delta tal1$ und $\Delta sol4$ vermehrt signifikante Änderungen in den Konzentrationen (vgl. Abschnitt 4.3.2.1 Abbildung 37). Die Funktionen der *PRS* - Gene wurden bereits im Abschnitt 5.2.1 angesprochen. Interessanterweise zeigte sich für die *PRS* - Deletionen kaum ein Einfluss auf die Histidinkonzentration, obwohl der an der Histidinsynthese beteiligte Metabolit durch die Deletionen beeinträchtigt sein müsste. Aufgrund der Tatsache, dass bspw. die *SOL4* - Deletion neben $\Delta prs3$ unter allen Mutanten die höchste Anzahl an veränderten Aminosäuren aufwies, lässt sich annehmen, dass sich eventuell die gestörte NADPH-Synthese nachteilig auf die Aminosäuren auswirkt. Die Gene *SOL1-4* sind zusammen mit den Genen *GND1-2* und *ZWF1* als Bestandteil des oxidativen PPP zur Synthese von NADPH notwendig [8]. PRPP dient u.a. ebenfalls als Cofaktor der $NAD^+/NADP^+$ -Synthese [259]. Als weitere intrazelluläre NADPH-Quellen dienen u.a. Acetaldehyddehydrogenasen, Isocitratdehydrogenasen sowie das Malatenzym [260, 261]. Unter den drei Mutanten zeigten sich als Gemeinsamkeiten ebenfalls erhöhte Konzentrationen der Aminosäuren, welche aus α -Ketoglutarat hervorgehen (Prolin, Arginin, Glutamin, Glutamat) sodass angenommen werden kann, dass ein erhöhter Umsatz des Citratzyklus vorliegt. Zusätzlich waren bei der $\Delta tal1$ - Mutante die verringerten Konzentrationen von Phenylalanin und Tyrosin auffällig. Die Ursache dafür liegt vermutlich darin, dass durch den Ausfall von *TAL1*, welche die Umsetzung von G3P und S7P zu E4P und F6P katalysiert, nur geringe Konzentrationen an E4P vorhanden sind, welches zusammen mit PEP die effiziente Synthese der aromatischen Aminosäuren garantiert. Insgesamt konnten für alle PPP-Mutanten unter Glucose die häufigsten positiven Änderungen für Arginin, Glutamat, Serin festgestellt werden (20-43% betroffene Mutanten).

Unter dem Einfluss von Galactose zeigte sich für die PPP-Mutanten ein stärkerer Effekt auf den Aminosäurepool (vgl. Abschnitt 4.3.2.2 Abbildung 43). Es traten erneut die meisten Änderungen für die *PRS*- und *SOL* - Mutanten sowie für die Mutanten $\Delta tal1$ und $\Delta tk11$ auf. Die Effekte der Deletionen wirkten sich unter Galactose jedoch stärker auf die aromatischen Aminosäuren aus, deren Konzentrationen zumeist

verringert waren. Die Deletionen von der Hauptisoformen der Transaldolasen (Tal1p) und Transketolasen (Tkl1p) zeigten die Relevanz dieser Reaktionen zum Aufbau der aromatischen Aminosäuren, da diese tendenziell in ihrer Konzentration verringert waren. *TKL1* ist unter anderem für die Synthese der aromatischen Aminosäuren essentiell [234]. Die Auswirkungen der *TKL1* - Deletion waren jedoch schwächer als erwartet, was womöglich in der generellen Prototrophie der Stämme begründet war bzw. daran, dass sie teilweise durch deren Isoform komplementiert werden konnten. Die Auswirkungen der PPP-Deletionen auf die Aminosäuren, welche nicht aus dem PPP hervorgehen, sind erneut nur relativ schwierig zu erklären. Möglicherweise bietet die Interkonnektion des PPP mit der Glycolyse über die Metaboliten G6P, F6P und G3P dabei eine regulative Möglichkeit die Konzentrationen der, aus der Glycolyse und dem Citratzyklus hervorgehenden, Aminosäuren zu beeinflussen, was jedoch hier nicht abschließend geklärt werden kann. Weiterhin sind zahlreiche Interkonversionen zwischen den Aminosäuren vorstellbar, was die inhomogene Konzentrationsentwicklung einiger Aminosäuren aus gleichen metabolischen Vorläufern erklären würde. Beispielsweise finden sich unter den Mutanten erneut am häufigsten erhöhte Argininkonzentrationen, jedoch zeigen Glutamin, Glutamat und Prolin hier eher gegenläufige Trends zu Arginin. Möglicherweise werden einzelne Aminosäuren zu Arginin konvertiert (zumeist Glutamat). Dennoch ist eine direkte Verbindung des PPP und dessen Beeinflussung der Argininlevel weiterhin nicht klar. Neben den erhöhten Argininleveln (56% der Mutanten betroffen) zeigten sich allgemein bei allen Mutanten besonders verringerte Level an Prolin (bei 37% der Mutanten).

Unter Ethanol traten für die PPP-Mutanten im Vergleich zu den Zuckern Glucose und Galactose allgemein die wenigsten Änderungen in den Aminosäurekonzentrationen auf (vgl. Abschnitt 4.3.2.3 Abbildung 49). Eine mögliche Ursache könnte darin begründet sein, dass der PPP unter Ethanol eine vergleichsweise relativ geringe Aktivität aufweist. Untersuchungen zur Adaptation von Hefezellen beim Übergang von glykolytischen zum gluconeogenetischen Stoffwechsel haben gezeigt, dass es nach der Verwertung von Glucose zu Umstellungen im Stoffwechsel kommt [167]. Dabei wurde vor allem beobachtet, dass es bezüglich der Bildung des Cofaktors NADPH zu einer Verlagerung der NADPH-Produktion vom PPP in Richtung der oxidativen Reaktionen der Acetaldehyddehydrogenase sowie der Isocitratdehydrogenase kommt. Dies wurde zudem durch Genexpressionsanalysen unterstützt. Diese Verlagerung der NADPH-Produktion war begleitet von einer vollständigen Inaktivierung des

oxidativen Teils des PPP, während aus dem nicht-oxidativen Teil nur die Reaktionen, welche zur Bildung von Ribose und Erythrose führten, weiterhin aktiv blieben. Die Autoren der Studie nahmen an, dass der Grund für die Umstellung der NADPH-Quelle in der Erhöhung der energetischen Effizienz der Zelle zu suchen ist, da die Zellen unter nicht-fermentativen Bedingungen den Flux durch die Gluconeogenese erhöhen müssten, was zusätzlich Energie in Form von ATP verbrauchen würde. Unter normalen Glycolysebedingungen erfordert die Produktion von NADPH über die Route des PPP keine Energieinvestition. In Anbetracht dieser Studie erscheinen die beobachteten erhöhten Level von Leucin, Tryptophan und Phenylalanin logisch, wenn man, wie für Ethanol typisch, eine erhöhte Aktivität der Gluconeogenese sowie nur die Aktivität des nicht-oxidativen Teils des PPP voraussetzt.

Der Vergleich bezüglich gemeinsam veränderter Aminosäuren unter den verschiedenen Kohlenstoffquellen ergab ein ähnliches Bild zu den Glycolysemutanten (vgl. Abschnitt 4.3.3.2 Abbildung 52). Viele der beobachteten Konzentrationsänderungen traten spezifisch nur unter einer der drei Kohlenstoffquellen auf. Dabei wurden für die PPP-Mutanten ebenfalls die meisten Gemeinsamkeiten zwischen Glucose und Galactose beobachtet. Nur die beiden Mutanten $\Delta tal1$ (bei Tyrosin, Alanin) und $\Delta prs5$ (bei Prolin) zeigten unter allen drei Kohlenstoffquellen konstant veränderte Konzentrationen, sodass sich hier diese beiden Gene als potentielle Regulatoren dieser Aminosäuren ergeben.

Als abschließendes Fazit zur Beurteilung der Aminosäureprofile von Glycolyse- und PPP-Mutanten lassen sich folgende Beobachtungen verallgemeinern. Diejenigen Deletionsmutanten des Stoffwechselwegs Glycolyse, welche Enzyme betreffen, deren Metabolite nachfolgend zur Synthese von Aminosäuren verwendet werden können, zeigen unter Glucose die häufigsten Änderungen in einer Vielzahl an Aminosäuren. Das betraf besonders die durch *PYC1*, *PYC2*, *GPM2* und *PYK2* codierten Enzyme. Unter Galactose zeigten vor allem diejenigen Mutanten, welche nahe am Eintrittspunkt von Galactose in die Glycolyse (Eintritt über Glucose-6-phosphat) lokalisiert sind, die stärkste Wirkung auf den Aminosäurepool. Dies betraf besonders Enzyme, welche durch *FBP1*, *GLK1* und *PFK1* codiert werden. Unter Ethanol traten besonders die Mutanten mit der stärksten Wirkung auf den Aminosäurepool in Erscheinung, welche für den Metabolismus unter Ethanol (Gluconeogenese) wichtig

sind. Diese codierten für die klassischen Enzyme der Gluconeogenese *PYC1*, *GLK1* und *FBP1*.

Im Falle der PPP-Mutanten traten die größten Störungen des Aminosäurepools unter allen Kohlenstoffquellen vor allem für die Mutanten der *PRS* - Gene sowie der *SOL* - Gene und für *TAL1* bzw. *TKL1* auf, wobei dies vermutlich auf Störungen des NADPH-Haushalts bzw. dem verringerten Gesamtumsatzes des PPP (am Beispiel des relativ inaktiven PPP unter Ethanol) zurückzuführen ist.

5.2.2.3 Aminosäuren zeigen stabile Korrelationen und Konzentrationen unter Glucose, Galactose, Ethanol

Da die verschiedenen Aminosäuren teilweise aus gemeinsamen metabolischen Vorläufern hervorgehen, wurde angenommen, dass sich eventuell, über alle Mutanten betrachtet, korrelative Aussagen bezüglich der Aminosäuren treffen lassen müssten. Im Zuge der Analyse der Aminosäureverteilungsprofile von Glycolyse-/ PPP-Mutanten konnten verschiedene korrelative Abhängigkeiten bezüglich der Aminosäuren für die jeweiligen, spezifischen Umweltbedingungen aufgedeckt werden (vgl. Abschnitt 4.3.3.4 Abbildung 55). Einige dieser Korrelationen waren sehr variabel zwischen den Kohlenstoffquellen, andere wiederum zeigten über alle Kohlenstoffquellen eine höhere korrelative Konstanz. Für die glykolytischen Mutanten bestand dabei die höchste Korrelation zwischen den Aminosäuregruppen Threonin, Aspartat, Glycin sowie zwischen Serin, Glutamin und Alanin, Isoleucin, Valin, Tryptophan. Für die PPP-Mutanten zeigte sich die korrelative Konstanz vor allem für Lysin, Arginin, Glutamin und Serin, Threonin sowie zwischen Valin, Isoleucin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, wobei die Korrelationen zwischen Phenylalanin und Tryptophan besonders ausgeprägt waren.

Korrelationsanalysen von Aminosäuren bei Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels wurden bisher nicht untersucht. Allgemein belaufen sich Korrelationsanalysen von Aminosäuren bisher zumeist auf Studien zur Aminosäureverteilung in Proteinen [262] bzw. auf pathologische Fragestellungen [263]. Studien zum korrelativen Verhalten von Aminosäuren bezüglich des Metabolismus sind selten. Am Beispiel der glykolytischen Oszillationen wurden dennoch einige korrelative Beziehungen zwischen einigen Aminosäuren beobachtet. Als glykolytische Oszillationen werden in der Regel die zeitabhängigen Konzentrationsänderungen von Metaboliten der Glycolyse bezeich-

net, wobei die Metaboliten dabei periodisch in ihrer Konzentration ansteigen bzw. abfallen [264]. Daneben existieren noch weitere Oszillationen die bspw. Metaboliten des Citratzyklus betreffen [253]. Die Ursachen dieser Oszillationen liegen an der gegenseitigen Beeinflussung der Metaboliten untereinander über die klassischen Regulationsmöglichkeiten (Feedback-Inhibierung/Aktivierung etc.) [265]. Studien von Hans *et al.* ergaben dabei beispielsweise, dass die Oszillationen bei den Aminosäuren vor allem diejenigen betreffen, die direkt aus den metabolischen Vorläufern (3-PG, Pyruvat, Oxalacetat) entstehen. In dem Zusammenhang traten konstante periodische Veränderungen vor allem bei Valin, Serin, Leucin, Aspartat, Lysin, Alanin und Asparagin auf, welche ebenfalls mit den metabolischen Oszillationen korrelierten. Die Aminosäuren Glutamat, Glutamin, Glycin, Methionin sowie die aromatischen Aminosäuren zeigten ebenfalls zeitabhängige Konzentrationsänderungen, jedoch waren diese Änderungen eher chaotisch, d.h. ohne klar erkennbares periodisches Muster. Anhand der Konzentrationstrends über einen gewissen Zeitraum wurde zudem beobachtet, dass besonders die Gruppe Valin, Serin, Leucin; die Gruppe Aspartat und Lysin (mit leichter Phasenverschiebung) und die beiden Paarungen Alanin und Asparagin sowie Glutamin und Glutamat Korrelationen bezüglich ihrer Konzentrationstrends aufwiesen [266]. Andere Studien zu Glucose limitierten, kontinuierlichen Wachstumsbedingungen identifizierten u.a. Lysin als stark oszillierende Aminosäure, wobei Lysin dabei stark von α -Ketoglutarat abhängig war und des Weiteren eine korrelative Beziehung zwischen Serin und 3PG bestand [253]. Inwiefern die hier beobachteten Korrelationen mit den intrazellulären Oszillationen bzw. Zellzyklus abhängigen Verhalten der Metaboliten oder anderen regulativen Mechanismen der Zelle in Zusammenhang stehen muss in weiterführenden Studien separat beantwortet werden.

Neben den Korrelationsanalysen wurden zusätzlich die Konzentrationstrends der einzelnen Aminosäuren entsprechend ihrer gemeinsamen metabolischen Vorläufer untersucht (vgl. Abschnitt 4.3.3.3 Abbildung 53/54). Im Vergleich der Mutanten aus Glycolyse und PPP war zu beobachten, dass die höchste Konstanz unter den drei Kohlenstoffquellen im Fall der Glycolysemutanten für die Aminosäuren Methionin, Lysin, Threonin, Glutamat, Prolin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin auftrat. Spezifisch nur für eine Zuckerquelle abweichende Konzentrationen traten in der Regel nur unter Ethanol für die Aminosäuren Asparagin, Isoleucin, Glutamin, Arginin, Alanin, Valin, Serin, Glycin und Histidin auf. Die höchste Variabilität

ergibt sich für Aspartat und Leucin (vgl. Abschnitt 4.3.3.3 Abbildung 53). Bei den PPP-Mutanten fand sich die höchste Konstanz unter den Aminosäuren Lysin, Threonin, Glutamin, Prolin, Alanin, Valin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Glycin und Histidin. Spezifisch unter einem Substrat abweichende Konzentrationen traten für Glutamat, Arginin unter Ethanol und für Serin unter Glucose auf. Die insgesamt größte Variabilität in der Konzentration trat bei Methionin, Isoleucin und erneut Leucin auf (vgl. Abschnitt 4.3.3.3 Abbildung 54).

Daraus ergab sich insgesamt für die beiden Mutantensets aus Glycolyse und PPP für Lysin, Threonin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin die höchste Konstanz unter allen drei Kohlenstoffquellen (Glucose, Galactose, Ethanol). Für Arginin und Serin traten spezifische Änderungen bei nur einer Kohlenstoffquelle auf. Leucin zeigte allgemein die höchste Variabilität der Konzentration unter allen untersuchten Kohlenstoffquellen.

5.2.2.4 Diagnostisches und biotechnologisches Potential von Aminosäureprofilen aus Stoffwechselmutanten

Im einleitenden Kapitel dieser Dissertation wurden bereits die Vorzüge von systembiologischen Analysen angesprochen. Die Möglichkeiten, welche sich durch die Analyse der verschiedenen regulativen Ebene der Zelle ergeben sind vielseitig. Aus diesen Gründen ist in den letzten Jahren auch das Interesse an Aminosäuren speziell für das Gebiet der Metabolomics gewachsen, welches darauf ausgelegt ist, die metabolischen Antworten der Zelle auf interne und externe Störungen zu untersuchen. Aminosäuren wirken u.a. als Energielieferant, was besonders an der Funktion der Glutaminolyse im Zusammenhang mit proliferierenden Zellen während der Tumorgenese bzw. der Krankheit Krebs deutlich wird, wobei die Glutaminolyse neben der Glycolyse als eine der wichtigsten Energiequellen verwendet wird [267–269]. Einige Studien haben zudem bereits den medizinischen Nutzen der Metabolomanalysen im Kontext mit den Aminosäuren aufgezeigt. So konnte u.a. Glycin als ein wichtiger Onkometabolit identifiziert werden, da dieser sehr stark mit der Proliferation von Krebszellen korreliert [270]. Aminosäureprofile wurden zudem zur Erkennung bzw. Früherkennung von Krebs genutzt, wobei dabei besonders Glutamat, Histidin, Prolin und Tyrosin als Marker Anwendung fanden [271]. Die Untersuchungen der Effekte von genetischen bzw. umweltbedingten Perturbationen auf das Level der Aminosäuren

könnten daher eine Relevanz für therapeutische Ansätze im Zusammenhang mit genetisch bedingten Stoffwechselstörungen haben.

Abseits ihres diagnostischen Potentials ermöglichen Kenntnisse der Aminosäureverteilungsprofile die Entwicklung biotechnologischer Anwendungen in Hinblick auf die Aminosäuregewinnung aus gentechnisch modifizierten Mikroorganismen bzw. Pflanzen wie bspw. *Corynebacterium glutamicum* oder *Arabidopsis thaliana* [272]. Der Fokus dabei vor allem in der Entwicklung von Alternativen zur kostspieligen chemischen Synthese von Aminosäuren. Anwendung finden Aminosäuren heutzutage besonders in den Bereichen der Lebensmittel-, Futtermittel- sowie pharmazeutischen Industrie. Zur biotechnologischen Gewinnung von Aminosäuren werden verschiedene Konzepte verfolgt. Einerseits können bestehende Aminosäurebiosynthesewege derart modifiziert werden, dass eine gesteigerte Produktion spezifischer Aminosäuren möglich wird. Beispielsweise kann dabei der intrazelluläre regulatorische Rückkopplungsmechanismus (Feedback-Regulation), welcher u.a. charakteristisch für die Aminosäurebiosynthese ist, durch genetische Modifikationen umgangen werden, sodass die gewünschte Aminosäure überproduziert wird. Dies konnte bspw. für den Aspartatbiosyntheseweg in *A. thaliana* demonstriert werden, dessen Enzym Dihydrodipicolinatsynthase auf Insensitivität hinsichtlich der Feedback-Regulation mutiert wurde, was in der gesteigerten Produktion von Lysin resultierte [273]. Modifikationen andere Enzyme desselben Synthesewegs in *Bacillus methanolicus* resultierten in einer 80-fachen Steigerung der Lysinkonzentration [274]. Neben den eigentlichen Aminosäurebiosynthesewegen können zudem Modifikationen im Kohlenhydratstoffwechsel gezielt zur Überproduktion von Aminosäuren genutzt werden. Dies wurde am Beispiel des Enzyms Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) des Bakteriums *C. glutamicum* demonstriert, wobei eine Überproduktion dieses Enzyms zu einem erhöhten Flux durch den PPP und der damit verbundenen Steigerung der intrazellulären NADPH-Level führte, was wiederum eine gesteigerte Lysinproduktion aufgrund der erhöhten NADPH-Level nach sich zog [275]. Eine weitere Möglichkeit die Produktion spezifischer Aminosäuren zu steigern liegt in der Wahl des Wachstumsmediums bzw. in der Kombination verschiedener Medien. Auf diese Art wurde in *E. coli* und *C. glutamicum* eine gesteigerte Methioninproduktion durch variierende Schwefelquellen erreicht. Der Einsatz von Thiosulfat, Thiosulfid oder Methanthiol anstelle von Sulfat resultierte dabei in einer deutlich gesteigerten Methioninsynthese [276]. Anhand dieser biotechnologischen Anwendungen, von denen

sich zahlreiche Beispiele in diversen Organismen finden lassen, konnte exemplarisch das Potential von Studien des Stoffwechsels bezüglich der Ebene der Aminosäuren verdeutlicht werden. Trotz dessen sind selbstverständlich weitere Studien notwendig, um die Effekte genetischer Deletionen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Umweltbedingungen weiter aufzuklären und daraus mögliche Ziele zur Manipulation des intrazellulären Aminosäurepools zu identifizieren.

6 Zusammenfassung

Der erste Teil der Dissertation befasste sich mit der Analyse zweier Gene, welche sich in einem kompetitiven Haploprofizienzscreen zur chronologischen Alterung angereichert haben. Die Studien an *VHR1* und *NQM1* haben gezeigt, dass sich die Interaktion der beiden Gene in einem Haploprofizienzphänotyp in sowohl kompetitiven als auch nicht-kompetitiven chronologischen Alterungsexperimenten ausprägt, welcher sich als erhöhte Klonogenizität während der stationären Phase manifestiert. Es konnte nachgewiesen werden dass *NQM1* ein durch Glucose reprimiertes Gen darstellt, dessen Funktion vermehrt unter gluconeogenetischen Bedingungen anzusiedeln ist. *NQM1* stellt zudem eine, durch diverse Stressarten induzierte, Isoform von *TAL1* dar, wird aber unabhängig von dieser reguliert und erfüllt daher höchstwahrscheinlich eine abweichende biochemische Funktion. Die Expression von *NQM1* wird in Abhängigkeit der zugrundeliegenden Stressquelle durch den Transkriptionsfaktor *VHR1* reguliert (Kalorierestriktion, osmotischer Stress) und ist dabei in ihrer Ausprägung von der Präsenz des *VHR1* - Transkriptionsfaktors abhängig. Der detaillierte molekulare Mechanismus über den *NQM1* in den Metabolismus unter stationären Bedingungen involviert ist und inwiefern *VHR1* generell an der Langzeitadaptation bzw. der Langzeitregulation von *NQM1* beteiligt ist, muss in zukünftigen Studien weiter aufgeklärt werden. Dennoch zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse deutlich, dass *NQM1* den zentralen Kohlenhydratstoffwechsel beeinflusst und zusätzlich in die, für den Alterungsprozess charakteristischen Facetten wie bspw. der Abwehr von oxidativen und osmotischen Stress, sowie Kalorierestriktion involviert ist.

Im zweiten Teil der Dissertation wurden die Effekte von kombinierten genetischen und umweltbedingten Perturbation (alternative Kohlenstoffquellen Glucose, Galactose, Ethanol) der zentralen Kohlenhydratstoffwechselwege Glycolyse und Pentosephosphatweg auf die Verteilung der intrazellulären Aminosäuren hin untersucht. Dabei wurde demonstriert, dass sich die Aminosäureverteilungsprofile innerhalb der Gruppe von entweder Glycolyse bzw. Pentosephosphatwegmutanten

unter dem Einfluss von Glucose und Galactose ähnlicher sind als unter Ethanol, wo die Konzentrationsverhältnisse zumeist im Trend invertiert waren. Der Einfluss der Kohlenstoffquellen dominierte dabei über die genetischen Deletionen, sodass deutlich separierte Muster in den Aminosäureverteilungsprofilen zwischen Glucose, Galactose und Ethanol identifiziert werden konnten. Allgemein offenbarte sich eine Konstanz des intrazellulären Aminosäurepools hinsichtlich genetischer Perturbationen der Stoffwechselwege Glycolyse- und PPP, da die Konzentrationen in den Deletionsmutanten maximal um das Vierfache zum Wildtyp verändert waren. Deletionen in zentralen Positionen, an denen Metaboliten generiert werden, welche zur Synthese von Aminosäuren notwendig sind, zeigten unter Glucose stark veränderte Aminosäurelevel. Gleiches galt für spezifische Enzyme des Gluconeogenese unter nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol). Die beobachteten Veränderungen in den Mutanten waren häufig spezifisch für eine Kohlenstoffquelle. Konstante Veränderungen in spezifischen Aminosäuren unter Glucose, Galactose, Ethanol wurden nur bei den Mutanten $\Delta pyc2$, $\Delta fbp1$, $\Delta prs5$, $\Delta tal1$ festgestellt. Des Weiteren konnten für die Aminosäuren korrelative Beziehungen und deren Konstanz unter den Kohlenstoffquellen demonstriert werden. Für die Glycolysemutanten bestand dabei die höchste Korrelation zwischen den Aminosäuregruppen Threonin, Aspartat, Glycin sowie zwischen Serin, Glutamin und Alanin, Isoleucin, Valin, Tryptophan. Für die Pentosephosphatwegmutanten zeigte sich die korrelative Konstanz vor allem für Lysin, Arginin, Glutamin und Serin, Threonin sowie zwischen Valin, Isoleucin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin. Analysen zur individuellen Konzentration der jeweiligen Aminosäuren unter Glucose, Galactose, Ethanol ergaben zudem für beide Sets an Mutanten, vor allem für Lysin, Threonin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin die höchste Konstanz und für Leucin die höchste Variabilität der Konzentrationen unter allen untersuchten Kohlenstoffquellen.

7 Summary

The first part of the thesis was focused on the analyses of two genes that were enriched in a competitive haploproficiency screen related to chronological aging in yeast. Studying the function of *VHR1* and *NQM1* led to the observation that the interaction of both genes manifested in a haploproficient phenotype of enhanced clonogenicity upon stationary phase in both competitive and non-competitive chronological aging experiments. It was shown, that *NQM1* reflects a glucose repressed gene which functions primarily under gluconeogenic conditions. Moreover, *NQM1* represents a stress inducible isoform of the transaldolase *TAL1*, but is regulated independently of *TAL1* and thus possibly fulfills an alternative biochemical function. The expression of *NQM1* is dependent on the applied stress and thereby regulated by the transcription factor *VHR1* (e.g. under conditions of osmotic stress and caloric restriction) which also affects the magnitude of the *NQM1* expression. The detailed molecular mechanism in which *NQM1* is implicated in the metabolism of the late stationary phase and how the interaction of *VHR1* and *NQM1* is necessary for long-time adaption or long-time regulation needs to be elucidated in future studies. However, the data presented here have shown that *NQM1* affects glucose metabolic activity in yeast stationary phase, under oxidative stress, osmotic stress and caloric restriction, and is thus implicated in different facets of the aging process.

The second part of the thesis was focused on the effects of how combined environmental (alternative carbon sources glucose, galactose, ethanol) and genetic perturbations of two main pathways of the central carbon metabolism (glycolysis and pentose phosphate pathway) influence the distribution of intracellular amino acids. It was demonstrated that the amino acid profiles of either glycolytic or pentose phosphate pathway-associated mutants do show more similarities when grown in glucose or galactose as in ethanol, which showed mostly inverted concentration trends. The influence of the carbon substrates dominated over genetic mutations, which was clearly shown by the distinct profile patterns. In general, the intracellular amino

acid pool depicted stability against genetic perturbations of glycolysis or pentose phosphate pathway enzymes since the amino acid concentrations in-/decreased not more than 4-fold compared to wild type level. Deletions in central pathway positions whose metabolites are building blocks to amino acids showed more changes on glucose as sole carbon source. Deletions affecting gluconeogenic enzymes showed more changes on non-fermentable carbon sources (ethanol). In general, most of the concentration changes identified within the mutants were specific to one carbon source. Persisting amino acid changes among all three carbon sources were only identified for $\Delta pyc2$, $\Delta fbp1$, $\Delta tal1$, $\Delta prs5$. Correlative associations among amino acids were discovered and their stability could be confirmed among the carbon sources. For the glycolytic mutants, highest correlation was shown for threonine, aspartate, glycine as well as for serine, glutamine and the group of alanine, isoleucine, valine, tryptophan. For the pentose phosphate pathway mutants, highest correlative stability was shown for lysine, arginine, glutamine as well as for serine, threonine and the group of valine, isoleucine, tryptophan, tyrosine, phenylalanine. Analyses of the individual concentrations of a specific amino acid on glucose, galactose or ethanol resulted in the most stable concentrations for lysine, threonine, proline, phenylalanine, tryptophan, tyrosine for both mutant sets among the carbon substrates. Leucine depicted the highest variability among all carbon sources.

Literaturverzeichnis

- [1] Erwin Schrödinger. *What is Life? The Physical Aspects of a Living Cell*. Cambridge University Press, 1944.
- [2] A. H. Romano and T. Conway. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Research in Microbiology*, 147(6-7):448–455, 1996.
- [3] Bernard Turcotte, Xiao Bei Liang, François Robert, and Nitnipa Soontornngun. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Research*, 10(1):2–13, 2010.
- [4] S. Haarasilta and L. Taskinen. Location of Three Key Enzymes of Gluconeogenesis in Baker’s Yeast. *Archives of Microbiology*, 113:159–161, 1977.
- [5] Nana-Maria Grüning, Mark Rinnerthaler, Katharina Bluemlein, Michael Mülleler, Mirjam M C Wamelink, Hans Lehrach, Cornelis Jakobs, Michael Breitenbach, and Markus Ralser. Pyruvate Kinase Triggers a Metabolic Feedback Loop that Controls Redox Metabolism in Respiring Cells. *Cell metabolism*, 14(3):415–27, September 2011.
- [6] Antje Krüger, Nana-Maria Grüning, Mirjam M C Wamelink, Martin Kerick, Alexander Kirpy, Dimitri Parkhomchuk, Katharina Bluemlein, Michal-Ruth Schweiger, Aleksey Soldatov, Hans Lehrach, Cornelis Jakobs, and Markus Ralser. The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxidants & redox signaling*, 15(2):311–24, July 2011.
- [7] Markus Ralser, Mirjam M C Wamelink, Simone Latkolik, Erwin E W Jansen, Hans Lehrach, and Cornelis Jakobs. Metabolic reconfiguration precedes transcriptional regulation in the antioxidant response. *Nature biotechnology*, 27(7):604–5, July 2009.
- [8] Markus Ralser, Mirjam M Wamelink, Axel Kowald, Birgit Gerisch, Gino Heeren, Eduard a Struys, Edda Klipp, Cornelis Jakobs, Michael Breitenbach, Hans Lehrach, and Sylvia Krobitsch. Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology*, 6(4):10, January 2007.
- [9] Marijke a H Luttik, Karin M. Overkamp, Peter Kötter, Simon De Vries, Johannes P. Van Dijken, and Jack T. Pronk. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38):24529–24534, 1998.

- [10] Peter Mitchell and Jennifer Moyle. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 213(5072):137–139, 1967.
- [11] Michael C. Lorenz and Gerald R. Fink. Life and death in a macrophage: Role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell*, 1(5):657–662, 2002.
- [12] H L Kornberg. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 99(1):1–11, 1966.
- [13] Scott A. Ensign. Revisiting the glyoxylate cycle: Alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Molecular Microbiology*, 61(2):274–276, 2006.
- [14] Tobias J. Erb, Georg Fuchs, and Birgit E. Alber. (2S)- Methylsuccinyl-CoA dehydrogenase closes the ethylmalonyl-CoA pathway for acetyl-CoA assimilation. *Molecular Microbiology*, 73(6):992–1008, 2009.
- [15] Maria Khomyakova, Özlem Bükmez, Lorenz K. Thomas, Tobias J. Erb, and Ivan A. Berg. A Methylaspartat Cycle in Haloarchaea. *Science*, 331(6015):334–337, 2011.
- [16] Per O. Ljungdahl and Bertrand Daignan-Fornier. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(3):885–929, 2012.
- [17] Zhengchang Liu, Janet Thornton, Mário Spírek, and Ronald a Butow. Activation of the SPS amino acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the phosphorylation state of a sensor component, Ptr3. *Molecular and cellular biology*, 28(2):551–563, 2008.
- [18] Per O Ljungdahl. Amino-acid-induced signalling via the SPS-sensing pathway in yeast. *Biochemical Society transactions*, 37(1):242–247, 2009.
- [19] Boris Magasanik and Chris a. Kaiser. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290(1-2):1–18, 2002.
- [20] T G Cooper and R a Sumrada. What is the function of nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*? *Journal of Bacteriology*, 155(2):623–627, 1983.
- [21] Kirk Staschke, Souvik Dey, John M. Zaborske, Lakshmi Reddy Palam, Jeanette N. McClintick, Tao Pan, Howard J. Edenberg, and Ronald C. Wek. Integration of general amino acid control and Target of Rapamycin (TOR) regulatory pathways in nitrogen assimilation in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 285(22):16893–16911, 2010.
- [22] Krishnamurthy Natarajan, Michael R Meyer, M Belinda, David Slade, Christopher Roberts, G Alan, Matthew J Marton, Belinda M Jackson, and Alan G Hinnebusch. Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13):4347–4368, 2001.
- [23] D Schluter, R E Ricklefs, G R Graves, D C Lees, C Kremen, L Andriamampianina, C Rahbek, J J Lennon, J a Lawrenson, J J D Greenwood, J R G Turner, R K Colwell, G C Hurtt, M R Willig, S K Lyons, P Koleff, K J Gaston, S Anderson, D J Currie, V Paquin, J T Kerr, L Packer, D Pomeroy, T M Crowe, a a Crowe, a J Stattersfield, D R Capper, G C L Dutson,

- Natural Resources, Lynx Edicions, B Bakker, W Wint, E Baker, N Baker, R Dowsett, M E Gartshore, H M De Klerk, M Languy, R B Payn, R Freckleton, N J Gotelli, P Harvey, R Lande, R May, I Owens, Supporting Online Material, and Supporting Text. Hierarchical Organization of Modularity in Metabolic Networks. *Science*, 297(5586):1551–1555, 2002.
- [24] Sandeep Krishna, a. M C Andersson, Szabolcs Semsey, and Kim Sneppen. Structure and function of negative feedback loops at the interface of genetic and metabolic networks. *Nucleic Acids Research*, 34(8):2455–2462, 2006.
- [25] Lars M Blank, Lars Kuepfer, and Uwe Sauer. Large-scale 13 C-flux analysis reveals mechanistic principles of metabolic network robustness to null mutations in yeast. *Genome Biology*, 6(6), 2005.
- [26] Lars Kuepfer, Uwe Sauer, and Lars M Blank. Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Research*, 15(10):1421–1430, 2005.
- [27] Nana-Maria Grüning, Hans Lehrach, and Markus Ralser. Regulatory crosstalk of the metabolic network. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(4):220–7, April 2010.
- [28] Brian T Weinert and Poala S Timiras. Invited review: Theories of aging. *Journal of Applied Physiology*, 95(4):1706–1716, 2003.
- [29] A Goffeau, B G Barrell, H Bussey, R W Davis, B Dujon, H Feldmann, F Galibert, J D Hoheisel, C Jacq, M Johnston, E J Louis, H W Mewes, Y Murakami, P Philippsen, H Tettelin, and S G Oliver. Life with 6000 Genes. *Science*, 274(546-6), 1995.
- [30] Aashiq H. Kachroo, Jon M. Laurent, Christopher M. Yellman, Austin G. Meyer, Claus O Wilke, and Edward M Marcotte. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science*, 348(6237), 2015.
- [31] R. K. Mortimer and J. R. Johnston. Life span of individual yeast cells. *Nature*, 183(4677):1751–1752, 1959.
- [32] Matt Kaeberlein. Lessons on longevity from budding yeast. *Nature*, 464(7288):513–519, 2010.
- [33] Heidi A. Tissenbaum and Leonard Guarente. Model organisms as a guide to mammalian aging. *Developmental Cell*, 2(1):9–19, 2002.
- [34] Anders Olsen, Maithili C. Vantipalli, and Gordon J. Lithgow. Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1):120–128, 2006.
- [35] K A Steinkraus, M Kaeberlein, and B K Kennedy. Replicative aging in yeast: the means to the end. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24:29–54, 2008.
- [36] D.A. Sinclair and L. Guarente. Extrachromosomal rDNA circles—a cause of aging in yeast. *Cell*, 91:1033–1042, 1997.

- [37] Leland H. Hartwell and Michael W. Unger. Unequal Division in *Saccharomyces cerevisiae* and its Implication for the Control of Cell Division. *Journal of Cell Biology*, 75(2):422–435, 1977.
- [38] Hugo Aguilaniu, Lena Gustafsson, Michel Rigoulet, and Thomas Nyström. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, 299(5613):1751–1753, 2003.
- [39] Nika Erjavec, Lisa Larsson, Julie Grantham, and Thomas Nyström. Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p. *Genes and Development*, 21(19):2410–2421, 2007.
- [40] Reinhard Nestelbacher, Peter Laun, Dagmar Vondráková, Alena Pichová, Christoph Schüller, and Michael Breitenbach. The influence of oxygen toxicity on yeast mother cell-specific aging. *Experimental Gerontology*, 35(1):63–70, 2000.
- [41] M. Gordon Barker, Lydia J E Brimage, and Katherine a. Smart. Effect of Cu,Zn superoxide dismutase disruption mutation on replicative senescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 177(2):199–204, 1999.
- [42] Ercan Selcuk Unlu and Ahmet Koc. Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1100:505–509, 2007.
- [43] Peter Laun, Alena Pichova, Frank Madeo, Jörg Fuchs, Adolf Ellinger, Sepp Kohlwein, Ian Dawes, Kai Uwe Fröhlich, and Michael Breitenbach. Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Molecular Microbiology*, 39(5):1166–1173, 2001.
- [44] Toren Finkel, Chu-Xia Deng, and Raul Mostoslavsky. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460(7255):587–591, 2009.
- [45] Markus Ralser, Steve Michel, and Michael Breitenbach. Sirtuins as regulators of the yeast metabolic network. *Frontiers in pharmacology*, 3(March):32, January 2012.
- [46] S Imai, C M Armstrong, M Kaeberlein, and L Guarente. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771):795–800, 2000.
- [47] Austen R D Ganley, Satoru Ide, Kimiko Saka, and Takehiko Kobayashi. The Effect of Replication Initiation on Gene Amplification in the rDNA and Its Relationship to Aging. *Molecular Cell*, 35(5):683–693, 2009.
- [48] Zhanna Shcheprova, Sandro Baldi, Stephanie Buvelot Frei, Gaston Gonnet, and Yves Barral. A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature*, 454(7205):728–734, 2008.

-
- [49] Nika Erjavec and Thomas Nyström. Sir2p-dependent protein segregation gives rise to a superior reactive oxygen species management in the progeny of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26):10877–10881, 2007.
- [50] Weiwei Dang, Kristan K Steffen, Rocco Perry, Jean A Dorsey, F Brad Johnson, Ali Shilatifard, Matt Kaerberlein, Brian K Kennedy, and Shelley L Berger. Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature*, 459(7248):802–807, 2009.
- [51] C B Epstein, J a Waddle, W Hale, V Davé, J Thornton, T L Macatee, H R Garner, and R a Butow. Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2):297–308, 2001.
- [52] S. Michal Jazwinski. The retrograde response links metabolism with stress responses, chromatin-dependent gene activation, and genome stability in yeast aging. *Gene*, 354(1-2 SPEC. ISS.):22–27, 2005.
- [53] S. Michal Jazwinski. Yeast replicative life span - The mitochondrial connection. *FEMS Yeast Research*, 5(2):119–125, 2004.
- [54] Paul a. Kirchman, Sangkyu Kim, Chi Yung Lai, and S. Michal Jazwinski. Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 152(1):179–190, 1999.
- [55] Ivanka Dilova, Ching Yi Chen, and Ted Powers. Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Current Biology*, 12(5):389–395, 2002.
- [56] Chi Yung Lai, Ewa Jaruga, Corina Borghouts, and S. Michal Jazwinski. A mutation in the ATP2 gene abrogates the age asymmetry between mother and daughter cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 162(1):73–87, 2002.
- [57] Denham Harman. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3):298–300, 1956.
- [58] Valter D. Longo, Edith B. Gralla, and Joan S. Valentine. Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(21):12275–12280, 1996.
- [59] V D Longo, L L Liou, J S Valentine, and E B Gralla. Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(1):131–142, 1999.
- [60] P Fabrizio, F Pozza, S D Pletcher, C M Gendron, and V D Longo. Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 292(5515):288–290, 2001.
- [61] Paola Fabrizio, Lee Loung Liou, Vanessa N. Moy, Alberto Diaspro, Joan Selverstone Valentine, Edith Butler Gralla, and Valter D. Longo. SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*, 163(1):35–46, 2003.

- [62] Paola Fabrizio, Luisa Battistella, Raffaello Vardavas, Cristina Gattazzo, Lee Loung Liou, Alberto Diaspro, Janis W. Dossen, Edith Butler Gralla, and Valter D. Longo. Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 166(7):1055–1067, 2004.
- [63] Valter D. Longo and Paola Fabrizio. Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Aging Research in Yeast*, pages 101–121. 2012.
- [64] Thomas Beck and Michael N. Hall. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762):689–692, 1999.
- [65] M T Martínez-Pastor, G Marchler, C Schüller, A Marchler-Bauer, H Ruis, and F Estruch. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO journal*, 15(9):2227–2235, 1996.
- [66] Erwin Swinnen, Valeria Wanke, Johnny Roosen, Bart Smets, Frédérique Dubouloz, Ivo Pedruzzi, Elisabetta Cameroni, Claudio De Virgilio, and Joris Winderickx. Rim15 and the crossroads of nutrient signalling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell division*, 1:3, 2006.
- [67] Min Wei, Paola Fabrizio, Jia Hu, Huanying Ge, Chao Cheng, Lei Li, and Valter D. Longo. Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genetics*, 4(1):0139–0149, 2008.
- [68] Ashley L. Alvers, Laura K. Fishwick, Michael S. Wood, Doreen Hu, Hye S. Chung, William a. Dunn, and John P. Aris. Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*, 8(4):353–369, 2009.
- [69] Chi Ming Wong, Yick Pang Ching, Yuan Zhou, Hsiang Fu Kung, and Dong Yan Jin. Transcriptional regulation of yeast peroxiredoxin gene TSA2 through Hap1p, Rox1p, and Hap2/3/5p. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(5):585–597, 2003.
- [70] Matt Kaeberlein, Alex A. Andalis, Gerald R. Fink, and Leonard Guarente. High Osmolarity Extends Life Span in *Saccharomyces cerevisiae* by a Mechanism Related to Calorie Restriction. *Molecular and Cellular Biology*, 22(22):8056–8066, 2002.
- [71] Dietmar E. Martin and Michael N. Hall. The expanding TOR signaling network. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(2):158–166, 2005.
- [72] Andrew M. Arsham and Thomas P. Neufeld. Thinking globally and acting locally with TOR. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(6):589–597, 2006.
- [73] Stephan Wullschleger, Robbie Loewith, and Michael N. Hall. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3):471–484, 2006.
- [74] Yong Pan and Gerald S. Shadel. Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density. *Aging*, 1(1):131–145, 2009.

- [75] Nicholas D. Bonawitz, Marc Chatenay-Lapointe, Yong Pan, and Gerald S. Shadel. Reduced TOR Signaling Extends Chronological Life Span via Increased Respiration and Upregulation of Mitochondrial Gene Expression. *Cell Metabolism*, 5(4):265–277, 2007.
- [76] Kristan K. Steffen, Vivian L. MacKay, Emily O. Kerr, Mitsuhiro Tsuchiya, Di Hu, Lindsay a. Fox, Nick Dang, Elijah D. Johnston, Jonathan a. Oakes, Bie N. Tchao, Diana N. Pak, Stanley Fields, Brian K. Kennedy, and Matt Kaeberlein. Yeast Life Span Extension by Depletion of 60S Ribosomal Subunits Is Mediated by Gcn4. *Cell*, 133(2):292–302, 2008.
- [77] Matt Kaeberlein, Christopher R. Burtner, and Brian K. Kennedy. Recent developments in yeast aging. *PLoS Genetics*, 3(5):655–660, 2007.
- [78] Tomohiro Yorimitsu, Shadia Zaman, James R. Broach, and Daniel J. Klionsky. Protein Kinase A and Sch9 Cooperatively Regulate Induction of Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 18:4180–4189, 2007.
- [79] Y. Kamada, T. Sekito, and Y. Ohsumi. Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 279:73–84, 2004.
- [80] Leonard Guarente. Mitochondria-A Nexus for Aging, Calorie Restriction, and Sirtuins? *Cell*, 132(2):171–176, 2008.
- [81] Paola Fabrizio and Valter D. Longo. Chronological aging-induced apoptosis in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(7):1280–1285, 2008.
- [82] Hugo Lavoie and Malcolm Whiteway. Increased respiration in the sch9 mutant is required for increasing chronological life span but not replicative life span. *Eukaryotic Cell*, 7(7):1127–1135, 2008.
- [83] Aili Zhang, Yubao Shen, Wenxuan Gao, and Jian Dong. Role of Sch9 in regulating Ras-cAMP signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 585(19):3026–3032, 2011.
- [84] Jenny C Y Chen and Ted Powers. Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Current Genetics*, 49(5):281–293, 2006.
- [85] S J Lin, P a Defossez, and L Guarente. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, 289(5487):2126–2128, 2000.
- [86] J C Jiang, E Jaruga, M V Repnevskaya, and S M Jazwinski. An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *The FASEB Journal*, 14(14):2135–2137, 2000.
- [87] A. L. Kruckeberg. The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 166(5):283–92, 1996.
- [88] S Ozcan, J Dover, a G Rosenwald, S Wölfl, and M Johnston. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *PNAS*, 93(22):12428–12432, 1996.

- [89] Frank Ning Li and Mark Johnston. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: Coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO Journal*, 16(18):5629–5638, 1997.
- [90] Marian Carlson. Regulation of glucose utilization in yeast. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(5):560–564, 1998.
- [91] Hiroshi Uemura, Miho Koshio, Yoko Inoue, M Cecilia Lopez, and Henry V Baked. Transcriptional Activation of Glycolytic Genes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 147:521–532, 1997.
- [92] A. Chambers, E. a. Packham, and I. R. Graham. Control of glycolytic gene expression in the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Current Genetics*, 29(1):1–9, 1995.
- [93] Juana M Gancedo. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2):334–361, 1998.
- [94] Sarah-Maria Fendt and Uwe Sauer. Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates. *BMC Systems Biology*, 4:12, 2010.
- [95] P Lesage, X Yang, and M Carlson. Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Molecular and Cellular Biology*, 16(5):1921–1928, 1996.
- [96] M Proft, P Kötter, D Hedges, N Bojunga, and K D Entian. CAT5, a new gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 14(24):6116–6126, 1995.
- [97] David J. Timson. Galactose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, pages 63–73, 2007.
- [98] J. F. Tschopp, S. D. Emr, C. Field, and R. Schekman. GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 166(1):313–318, 1986.
- [99] Ana Paula Oliveira, Christina Ludwig, Paola Picotti, Maria Kogadeeva, Ruedi Aebersold, and Uwe Sauer. Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Molecular systems biology*, 8(623):623, 2012.
- [100] E R Stadtman. Allosteric regulation of enzyme activity. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 28:41–154, 1966.
- [101] P. S. Ward and C. B. Thompson. Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), 2012.
- [102] Sarah-Maria Fendt, Joerg Martin Buescher, Florian Rudroff, Paola Picotti, Nicola Zamboni, and Uwe Sauer. Tradeoff between enzyme and metabolite efficiency maintains metabolic homeostasis upon perturbations in enzyme capacity. *Molecular Systems Biology*, 6(356):356, 2010.

-
- [103] Jennifer Christina Ewald, Tanja Matt, and Nicola Zamboni. The integrated response of primary metabolites to gene deletions and the environment. *Molecular Biosystems*, 9(3):440–6, March 2013.
- [104] R Wilson Powers, Matt Kaerberlein, Seth D Caldwell, Brian K Kennedy, and Stanley Fields. Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2):174–184, 2006.
- [105] Carrie Baker Brachmann, Adrian Davies, Gregory J Cost, Emerita Caputo, J. Li, P. Hieter, and J D Boeke. Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C : a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications. *Yeast*, 14(2):115–132, 1998.
- [106] E. a. Winzeler. Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science*, 285(5429):901–906, August 1999.
- [107] Michael Mülleler, Floriana Capuano, Pinar Pir, Stefan Christen, Uwe Sauer, Stephen G Oliver, and Markus Ralser. A prototrophic deletion mutant collection for yeast metabolomics and systems biology. *Nature biotechnology*, 30(12):1176–8, December 2012.
- [108] Hiroaki Inoue, Hiroshi Nojima, and Hiroto Okyama. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1):23–28, 1990.
- [109] Susanna Harju, Halyna Fedosyuk, and Kenneth R Peterson. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n’ Grab. *BMC biotechnology*, 4:8, April 2004.
- [110] R Daniel Gietz and Robert H Schiestl. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nature protocols*, 2(1):31–4, January 2007.
- [111] Audrey Morin, Adrian W Moores, and Michael Sacher. Dissection of *Saccharomyces cerevisiae* asci. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (27):1–3, January 2009.
- [112] F. Sherman and J. Hicks. Micromanipulation and dissection of asci. *Methods in Enzymology*, 191:21–37, 1991.
- [113] F Sanger and S Nicklen. DNA sequencing with chain-terminating. *PNAS*, 74(12):5463–5467, 1977.
- [114] Nana-Maria Gruening, Dijun Du, Markus A Keller, Ben F Luisi, and Markus Ralser. Inhibition of triosephosphate isomerase by phosphoenolpyruvate in the feedback-regulation of glycolysis. *Open Biology*, 4, 2014.
- [115] Wim de Koning and Karel van Dam. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 204(1):118–123, 1992.
- [116] Mirjam M C Wamelink, Eduard a Struys, Jojanneke H J Huck, Birthe Roos, Marjo S van der Knaap, Cornelis Jakobs, and Nanda M Verhoeven. Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC-MS/MS: application to two new inherited defects of metabolism. *Journal of Chromatography B*, 823(1):18–25, August 2005.

- [117] Markus a Keller, Alexandra V Turchyn, and Markus Ralser. Non-enzymatic glycolysis and pentose phosphate pathway-like reactions in a plausible Archean ocean. *Molecular systems biology*, 10:725, January 2014.
- [118] M. M. Wamelink, D. E. Smith, E. E. Jansen, N. M. Verhoeven, E. a. Struys, and C. Jakobs. Detection of transaldolase deficiency by quantification of novel seven-carbon chain carbohydrate biomarkers in urine. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(5):735–742, 2007.
- [119] M. M C Wamelink, D. E C Smith, C. Jakobs, and N. M. Verhoeven. Analysis of polyols in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A useful tool for recognition of inborn errors affecting polyol metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(6):951–963, 2005.
- [120] M W Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9):e45, May 2001.
- [121] Steve Michel, Markus a Keller, Mirjam Mc Wamelink, and Markus Ralser. A haploproficient interaction of the transaldolase paralogue NQM1 with the transcription factor VHR1 affects stationary phase survival and oxidative stress resistance. *BMC Genetics*, 16(1):1–14, 2015.
- [122] Hua Huang, Hui Rong, Xu Li, Shuilong Tong, Zhiqiang Zhu, Liwen Niu, and Maikun Teng. The crystal structure and identification of NQM1/YGR043C, a transaldolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proteins*, 73(4):1076–81, December 2008.
- [123] Roeland Costenoble, Paola Picotti, Lukas Reiter, Robert Stallmach, Matthias Heinemann, Uwe Sauer, and Ruedi Aebersold. Comprehensive quantitative analysis of central carbon and amino-acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under multiple conditions by targeted proteomics. *Molecular systems biology*, 7(464):464, February 2011.
- [124] Martijn Rep, Marcus Krantz, Johan M Thevelein, and Stefan Hohmann. The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the Induction of Subsets of High Osmolarity Glycerol Pathway-dependent Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12):8290–8300, March 2000.
- [125] Valter D Longo, Gerald S Shadel, Matt Kaeberlein, and Brian Kennedy. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell metabolism*, 16(1):18–31, July 2012.
- [126] Woo Kyu Kang, Yeong Hyeock Kim, Byoung-Soo Kim, and Jeong-Yoon Kim. Growth phase-dependent roles of Sir2 in oxidative stress resistance and chronological lifespan in yeast. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 52(8):652–8, August 2014.
- [127] Khandaker Ashfaqul Muid, Hüseyin Çağlar Karakaya, and Ahmet Koc. Absence of superoxide dismutase activity causes nuclear DNA fragmentation during the aging process. *Biochemical and biophysical research communications*, 444(2):260–3, February 2014.

- [128] Joon-Seok Choi and Cheol-Koo Lee. Maintenance of cellular ATP level by caloric restriction correlates chronological survival of budding yeast. *Biochemical and biophysical research communications*, 439(1):126–31, September 2013.
- [129] Philip I Merksamer, Yufei Liu, Wenjuan He, Matthew D Hirschey, Danica Chen, and Eric Verdin. The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. *Aging*, 5(3):144–50, March 2013.
- [130] M G Simic, D S Bergtold, and L R Karam. Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutation research*, 214:3–12, 1989.
- [131] Kevin a. Morano, Chris M. Grant, and W. Scott Moye-Rowley. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(April):1157–1195, 2012.
- [132] Frank Dieterle, Alfred Ross, Götz Schlotterbeck, and Hans Senn. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in ¹H NMR metabonomics. *Analytical Chemistry*, 78(13):4281–4290, 2006.
- [133] Diogo Camacho, Alberto Fuente, and Pedro Mendes. The origin of correlations in metabolomics data. *Metabolomics*, 1(1):53–63, 2005.
- [134] Matthias Weider, Agnes Machnik, Franz Klebl, and Norbert Sauer. Vhr1p, a new transcription factor from budding yeast, regulates biotin-dependent expression of VHT1 and BIO5. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(19):13513–24, May 2006.
- [135] G Lelandais, Z Kozovska, V Tanty, F Devaux, C Jacq, and T Delaveau. Early Expression of Yeast Genes Affected by Chemical Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5):1860–1868, 2005.
- [136] Igor B. Afanas'ev. Free radical mechanisms of aging processes under physiological conditions. *Biogerontology*, 6(4):283–290, 2005.
- [137] C B Harley, H Vaziri, C M Counter, and R C Allsopp. The telomere hypothesis of cellular aging. *Experimental gerontology*, 27(4):375–382, 1992.
- [138] Martijn E T Dollé and Jan Vijg. Genome dynamics in aging mice. *Genome Research*, 12(11):1732–1738, 2002.
- [139] E. Cohen, J. Bieschke, R.M. Perciavalle, J. W. Kelly, and A. Dillin. Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*, 313(5793):1604–1610, 2006.
- [140] Christopher R Burtner, Christopher J Murakami, Brian K Kennedy, and Matt Kaerberlein. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(8):1256–70, April 2009.
- [141] H Susana Marinho, Carla Real, Luísa Cyrne, Helena Soares, and Fernando Antunes. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox biology*, 2:535–562, January 2014.

- [142] Andrew P Capaldi, Tommy Kaplan, Ying Liu, Naomi Habib, Aviv Regev, Nir Friedman, and Erin K O'Shea. Structure and function of a transcriptional network activated by the MAPK Hog1. *Nature genetics*, 40(11):1300–6, November 2008.
- [143] Eva Herker, Helmut Jungwirth, Katharina a Lehmann, Corinna Maldener, Kai-Uwe Fröhlich, Silke Wissing, Sabrina Büttner, Markus Fehr, Stephan Sigrist, and Frank Madeo. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology*, 164(4):501–7, February 2004.
- [144] P. Ludovico, M. J. Sousa, M. T. Silva, C. Leão, and M. Côrte-Real. Saccharomyces cerevisiae commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147(9):2409–2415, 2001.
- [145] Paula Ludovico, Fernando Rodrigues, Agostinho Almeida, T Manuel, Antoni Barrientos, and Manuela Co. Cytochrome c Release and Mitochondria Involvement in Programmed Cell Death Induced by Acetic Acid in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular biology of Cell*, 13(August):2598–2606, 2002.
- [146] M M Zambrano, D a Siegele, M Almirón, A Tormo, and R Kolter. Microbial competition: Escherichia coli mutants that take over stationary phase cultures. *Science*, 259(5102):1757–1760, 1993.
- [147] Júlia Santos, Cecília Leão, and Maria João Sousa. Growth culture conditions and nutrient signaling modulating yeast chronological longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 2012.
- [148] Ziyun Wu, Shao Quan Liu, and Dejian Huang. Dietary Restriction Depends on Nutrient Composition to Extend Chronological Lifespan in Budding Yeast Saccharomyces cerevisiae. *PLoS ONE*, 8(5), 2013.
- [149] Julia Santos, Fernanda Leitao-Correia, Maria Joao Sousa, and Cecilia Leao. Ammonium is a key determinant on the dietary restriction of yeast chronological aging in culture medium. *Oncotarget*, 6(9):6511–6523, 2014.
- [150] Júlia Santos, Cecília Leão, and Maria João Sousa. Ammonium-dependent shortening of CLS in yeast cells starved for essential amino acids is determined by the specific amino acid deprived, through different signaling pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013.
- [151] Ziyun Wu, Lixia Song, Shao Quan Liu, and Dejian Huang. Independent and additive effects of glutamic acid and methionine on yeast longevity. *PLoS ONE*, 8(11), 2013.
- [152] John P. Aris, Ashley L. Alvers, Roy a. Ferraiuolo, Laura K. Fishwick, Amanda Hanvivatpong, Doreen Hu, Christine Kirlew, Michael T. Leonard, Kyle J. Losin, Michelle Marraffini, Arnold Y. Seo, Veronica Swanberg, Jennifer L. Westcott, Michael S. Wood, Christiaan Leeuwenburgh, and William a. Dunn. Autophagy and leucine promote chronological longevity

- and respiration proficiency during calorie restriction in yeast. *Experimental Gerontology*, 48(10):110–1119, 2013.
- [153] Esra Borklu Yucel and Kutlu O. Ulgen. A Network-Based Approach on Elucidating the Multi-Faceted Nature of Chronological Aging in *S. cerevisiae*. *PLoS ONE*, 6(12):e29284, December 2011.
- [154] Andras Perl. The pathogenesis of transaldolase deficiency. *IUBMB life*, 59(6):365–373, 2007.
- [155] Marta Papini, Intawat Nookaew, Gionata Scalcinati, Verena Siewers, and Jens Nielsen. Phosphoglycerate mutase knock-out mutant *Saccharomyces cerevisiae* : Physiological investigation and transcriptome analysis. *Biotechnology Journal*, 5:1016–1027, 2010.
- [156] Ling Cai, Mark a. McCormick, Brian K. Kennedy, and Benjamin P. Tu. Integration of Multiple Nutrient Cues and Regulation of Lifespan by Ribosomal Transcription Factor Ifh1. *Cell Reports*, 4(6):1063–1071, 2013.
- [157] Jd Williamson. Sugar alcohols, salt stress, and fungal resistance: polyols—multifunctional plant protection? *Journal of the . . .*, 127(4):467–473, 2002.
- [158] Wayne Loescher and John Everard. Regulation of Sugar Alcohol Biosynthesis. In *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, volume 9, pages 275–299. 2004.
- [159] Tomoyuki Toyoda and Kazuhisa Ohtaguchi. Role of lactose on the production of D-arabitol by *Kluyveromyces lactis* grown on lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2):691–701, 2010.
- [160] Jordan M. Ingram and W. a. Wood. Enzymatic Basis for d-Arabitol Production by *Saccharomyces rouxii*. *Journal of bacteriology*, 89(5):1186–1194, 1965.
- [161] Benoit Calmes, Thomas Guillemette, Lény Teyssier, Benjamin Siegler, Sandrine Pigné, Anne Landreau, Béatrice Iacomi, Rémi Lemoine, Pascal Richomme, and Philippe Simoneau. Role of mannitol metabolism in the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Frontiers in plant science*, 4(May):131, 2013.
- [162] Peter S. Solomon, Ormonde D C Waters, and Richard P. Oliver. Decoding the mannitol enigma in filamentous fungi. *Trends in Microbiology*, 15(6):257–262, 2007.
- [163] Birgit Jovanović, Robert L Mach, and Astrid R Mach-Aigner. Characterization of erythrose reductases from filamentous fungi. *AMB Express*, 3(1):43, 2013.
- [164] B Shen, S Hohmann, R G Jensen, and a H Bohnert. Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant physiology*, 121(1):45–52, 1999.
- [165] Kent R. Walters, Qingfeng Pan, Anthony S. Serianni, and John G. Duman. Cryoprotectant biosynthesis and the selective accumulation of threitol in the freeze-tolerant Alaskan beetle, *Upis ceramboides*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25):16822–16831, 2009.

- [166] Tom Birger Granström, Ken Izumori, and Matti Leisola. A rare sugar xylitol. Part I: The biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2):277–281, 2007.
- [167] Jennifer Ewald, Stefan Jol, Bastian Niebel, Paola Picotti, Ruedi Aebersold, Guillermo G Zampar, and Anne Ku. Temporal system-level organization of the switch from glycolytic to gluconeogenic operation in yeast. *Molecular Systems Biology*, 1(651), 2013.
- [168] Katalin Banki, Eliza Hutter, Emanuela Colombo, Nick J. Gonchoroff, and Andras Perl. Glutathione levels and sensitivity to apoptosis are regulated by changes in transaldolase expression. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51):32994–33001, 1996.
- [169] Clare E Simpson and Mark P Ashe. Adaptation to stress in yeast: to translate or not? *Biochemical Society transactions*, 40(4):794–9, August 2012.
- [170] Libuše Váchová, Michal Cáp, and Zdena Palková. Yeast colonies: a model for studies of aging, environmental adaptation, and longevity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, January 2012.
- [171] Dongmei Bai Flagfeldt, Verena Siewers, Le Huang, and Jens Nielsen. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 26(10):545–551, 2009.
- [172] Antje Krüger, Jakob Vowinkel, Michael Mülleler, Phillip Grote, Floriana Capuano, Katharina Bluemlein, and Markus Ralser. Tpo1-mediated spermine and spermidine export controls cell cycle delay and times antioxidant protein expression during the oxidative stress response. *EMBO reports*, 14(12):1113–9, December 2013.
- [173] Eulàlia de Nadal, Gustav Ammerer, and Francesc Posas. Controlling gene expression in response to stress. *Nature reviews. Genetics*, 12(12):833–45, December 2011.
- [174] a P Gasch, P T Spellman, C M Kao, O Carmel-Harel, M B Eisen, G Storz, D Botstein, and P O Brown. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11(12):4241–57, December 2000.
- [175] Audrey P Gasch and Margaret Werner-Washburne. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & integrative genomics*, 2(4-5):181–92, September 2002.
- [176] Audrey P Gasch. Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast*, 24(11):961–976, 2007.
- [177] Joerg Martin Buescher, Wolfram Liebermeister, Matthieu Jules, Markus Uhr, Jan Muntel, Eric Botella, Bernd Hessling, Roelco Jacobus Kleijn, Ludovic Le Chat, François Lecoïnte, Ulrike Mäder, Pierre Nicolas, Sjouke Piersma, Frank Rügheimer, Dörte Becher, Philippe Bessieres, Elena Bidnenko, Emma L Denham, Etienne Dervyn, Kevin M Devine, Geoff Doherty, Samuel Drulhe, Liza Felicori, Mark J Fogg, Anne Goelzer, Annette Hansen, Colin R

- Harwood, Michael Hecker, Sebastian Hubner, Claus Hultschig, Hanne Jarmer, Edda Klipp, Aurélie Leduc, Peter Lewis, Frank Molina, Philippe Noirot, Sabine Peres, Nathalie Pigeonneau, Susanne Pohl, Simon Rasmussen, Bernd Rinn, Marc Schaffer, Julian Schnidder, Benno Schwikowski, Jan Maarten Van Dijl, Patrick Veiga, Sean Walsh, Anthony J Wilkinson, Jörg Stelling, Stéphane Aymerich, and Uwe Sauer. Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6072):1099–103, March 2012.
- [178] Heather P Harding, Yuhong Zhang, Huiqing Zeng, Isabel Novoa, Phoebe D Lu, Marcella Calfon, Navid Sadri, Chi Yun, Brian Popko, Richard Paules, David F Stojdl, John C Bell, Thore Hettmann, Jeffrey M Leiden, David Ron, and North Carolina. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular cell*, 11(3):619–633, 2003.
- [179] A Madlung. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*, 110(2):99–104, 2013.
- [180] Feng-Quan Tan, Hong Tu, Wu-Jun Liang, Jian-Mei Long, Xiao-Meng Wu, Hong-Yan Zhang, and Wen-Wu Guo. Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement. *BMC Plant Biology*, 15(1):1–14, 2015.
- [181] Ossi Turunen, Ralph Seelke, and Jed Macosko. In silico evidence for functional specialization after genome duplication in yeast. *FEMS yeast research*, 9(1):16–31, February 2009.
- [182] Judith Scharte, Hardy Schön, Zeina Tjaden, Engelbert Weis, and Antje von Schaewen. Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19):8061–6, May 2009.
- [183] Ho Hee Jang, Kyun Oh Lee, Yong Hun Chi, Bae Gyo Jung, Soo Kwon Park, Jin Ho Park, Jung Ro Lee, Seung Sik Lee, Jeong Chan Moon, Jeong Won Yun, Yeon Ok Choi, Woe Yeon Kim, Ji Seoun Kang, Gang-Won Cheong, Dae-Jin Yun, Sue Goo Rhee, Moo Je Cho, and Sang Yeol Lee. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, 117(5):625–35, May 2004.
- [184] R J Haselbeck and L McAlister-Henn. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *The Journal of biological chemistry*, 268(16):12116–22, June 1993.
- [185] B Henke, W Girzalsky, V Berteaux-Lecellier, and R Erdmann. IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, 273(6):3702–11, February 1998.

- [186] Olga de Smidt, James C du Preez, and Jacobus Albertyn. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. *FEMS yeast research*, 8(7):967–78, November 2008.
- [187] Xiaoling Li and Nevzat Kazgan. Mammalian Sirtuins and Energy Metabolism. *International Journal of Biological Sciences*, 7(5):575–587, 2011.
- [188] Shu-Ping Lu and Su-Ju Lin. Regulation of yeast sirtuins by NAD(+) metabolism and calorie restriction. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(8):1567–75, August 2010.
- [189] Jeong-Ho Kim, Adhiraj Roy, David Jouandot, and Kyu Hong Cho. The glucose signaling network in yeast. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(11):5204–10, November 2013.
- [190] Raluca Gordân, Kevin F Murphy, Rachel P Mccord, Cong Zhu, Anastasia Vedenko, and Martha L Bulyk. Curated collection of yeast transcription factor DNA binding specificity data reveals novel structural and gene regulatory insights. *Genome Biology*, 12(12):R125, 2011.
- [191] Witold Jakubowski, Tomasz Bilinski, and Grzegorz Bartosz. Oxidative Stress during Aging of Stationary Cultures of *S. cerevisiae*. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(5):659–664, 2000.
- [192] Louise M. Nutter, Emily O. Ngo, Geoffrey R. Fisher, and Peter L. Gutierrez. DNA Strand Scission and Free Radical Production in Menadione- treated Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(4):2474–2479, 1992.
- [193] K. A. Vallis, J. Reglinski, M. Garner, M. M. E. Bridgeman, and C. R. Wolf. Menadione-resistant Chinese hamster ovary cells have an increased capacity for glutathione synthesis. *British Journal of Cancer*, 76(7):870–877, 1997.
- [194] W F Tzeng, T J Chiou, C P Wang, J L Lee, and Y H Chen. Cellular Thiols as a Determinant of Responsiveness to Menadione in Cardiomyocytes., July 1994.
- [195] Donald J. Reed. Glutathione: Toxicological Implications. *Annual Review of Pharmacological Toxicology*, 1990.
- [196] Valter D Longo, Joshua Mitteldorf, and Vladimir P Skulachev. Programmed and altruistic ageing. *Nature reviews. Genetics*, 6(11):866–72, November 2005.
- [197] Michael C Gustin, Jacobus Albertyn, Matthew Alexander, and Kenneth Davenport. MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4):1264, 1998.
- [198] J L Brewster, T de Valoir, N D Dwyer, E Winter, and M C Gustin. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, N.Y.)*, 259(5102):1760–3, March 1993.
- [199] Martijn Rep, Vladimír Reiser, Ulrike Gartner, M Johan, Stefan Hohmann, Gustav Ammerer, R Reiser, and Johan M Thevelein. Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8):5474–5485, 1999.

- [200] Elke Nevoigt and Ulf Stahl. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3):231–241, 1997.
- [201] Stefan Hohmann. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2):300–372, 2002.
- [202] C Schüller, J L Brewster, M R Alexander, M C Gustin, and H Ruis. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *The EMBO journal*, 13(18):4382–4389, 1994.
- [203] W. Mark Toone and Nic Jones. Stress-activated signalling pathways in yeast. *Genes to Cells*, 3(8):485–498, 1998.
- [204] J. R. Dickinson and M. Schweizer. Carbon metabolism. In *The Metabolism and Molecular Physiology in S. cerevisiae*. 1999.
- [205] Luciano Galdieri, Swati Mehrotra, Sean Yu, and Ales Vancura. Transcriptional regulation in yeast during diauxic shift and stationary phase. *Omics : a journal of integrative biology*, 14(6):629–38, December 2010.
- [206] Marian Carlson. Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, 2(2):202–207, 1999.
- [207] H. J. Schüller. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 43(3):139–60, 2003.
- [208] Emmanuelle Boy-marcotte, Michel Perrot, Françoise Bussereau, Hélian Boucherie, and Michel Jacquet. Msn2p and Msn4p Control a Large Number of Genes Induced at the Diauxic Transition Which Are Repressed by Cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(5):1044–1052, 1998.
- [209] J L Parrou, B Enjalbert, L Plourde, a Bauche, B Gonzalez, and J Francois. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(3):191–203, 1999.
- [210] Guillermo G Zampar, Anne Kümmel, Jennifer Ewald, Stefan Jol, Bastian Niebel, Paola Picotti, Ruedi Aebersold, Uwe Sauer, Nicola Zamboni, and Matthias Heinemann. Temporal system-level organization of the switch from glycolytic to gluconeogenic operation in yeast. *Molecular systems biology*, 9(651):651, January 2013.
- [211] S H Lillie and J R Pringle. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *Journal of bacteriology*, 143(3):1384–94, September 1980.
- [212] Takeshi Noda and Yoshinori Ohsumi. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7):3963–3966, 1998.
- [213] Margaret Werner-Washburne, Edward Braun, Gerald C. Johnston, and Richard A. Singer. Stationary Phase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 57(2):383–401, 1993.

- [214] R H De Deken. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology*, 44(2):149–156, 1966.
- [215] Henry N Higgs and Kevin J Peterson. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Molecular biology of the cell*, 16(1):1–13, 2005.
- [216] H. Alexandre, V. Ansanay-Galeote, S. Dequin, and B. Blondin. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 498(1):98–103, 2001.
- [217] Claudio a Masuda, Marcelle a Xavier, Katherine a Mattos, and Antonio Galina. Phosphoglucomutase is an in vivo lithium target in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41):37794–37801, 2001.
- [218] Nupur B. Dey, Pam Bounelis, Timothy a. Fritz, David M. Bedwell, and Richard B. Marchase. The glycosylation of phosphoglucomutase is modulated by carbon source and heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43):27143–27148, 1994.
- [219] L. Fu, P. Bounelis, N. Dey, B. L. Browne, R. B. Marchase, and D. M. Bedwell. The posttranslational modification of phosphoglucomutase is regulated by galactose induction and glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177(11):3087–3094, 1995.
- [220] Yukio Kimata, Yuki I Kimata, Yusuke Shimizu, Hiroshi Abe, Ileana C Farcasanu, Masato Takeuchi, Mark D Rose, and Kenji Kohno. Genetic Evidence for a Role of BiP / Kar2 That Regulates Ire1 in Response to Accumulation of Unfolded Proteins. *Molecular biology of the cell*, 14(June):2559–2569, 2003.
- [221] David P. Aiello, Lianwu Fu, Attila Miseta, Katalin Sipos, and David M. Bedwell. The Ca²⁺ homeostasis defects in a *pgm2Δ* strain of *Saccharomyces cerevisiae* are caused by excessive vacuolar Ca²⁺ uptake mediated by the Ca²⁺-ATPase Pmc1p. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37):38495–38502, 2004.
- [222] E Boles, W Liebetrau, M Hofmann, and F K Zimmermann. A family of hexosephosphate mutases in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 220(1):83–96, 1994.
- [223] Thomas Walther, Audrey Baylac, Ceren Alkim, Amélie Vax, Hélène Cordier, and Jean Marie François. The PGM3 gene encodes the major phosphoribomutase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 586(23):4114–4118, 2012.
- [224] I. Mor, E. C. Cheung, and K. H. Vousden. Control of glycolysis through regulation of PFK1: Old friends and recent additions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76:211–216, 2011.
- [225] P. Moore, F. Sagliocco, R. M. Wood, and J. Brown. Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. *Molecular and Cellular biology*, 11(10):5330–5337, 1991.

- [226] J. Heinisch. Construction and physiological characterization of mutants disrupted in the phosphofructokinase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 11(3):227 – 234, 1986.
- [227] Lars M Steinmetz, Curt Scharfe, Adam M Deutschbauer, Dejana Mokranjac, Zelek S Herman, Ted Jones, Angela M Chu, Guri Giaever, Holger Prokisch, Peter J Oefner, and Ronald W Davis. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nature genetics*, 31(4):400–404, 2002.
- [228] Gerhard Kopperschläger, Elke Usbeck, and Eberhard Hofmann. Studies on the oligomeric structure of yeast phosphofructo-kinase by means of cross-linking diimidoesters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(1):371–378, 1976.
- [229] Jocelyne Fiaux, Marco Sonderegger, Kurt Wütherich, Thomas Szyperski, and Uwe Sauer. Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. *Society*, 2(1):170–180, 2003.
- [230] N K Brewster, D L Val, M E Walker, and J C Wallace. Regulation of pyruvate carboxylase isozyme (PYC1, PYC2) gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and nonfermentative growth., 1994.
- [231] Vikas P Sukhatme and Barden Chan. Glycolytic cancer cells lacking 6-phosphogluconate dehydrogenase metabolize glucose to induce senescence. *FEBS Letters*, 586(16):2389–2395, 2012.
- [232] Y Lindqvist, G Schneider, U Ermler, and M Sundström. Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5 Å resolution. *The EMBO journal*, 11(7):2373–2379, 1992.
- [233] Ine Schaaff-Gerstenschläger, Gertrud Mannhaupt, Irene Vetter, Friedrich K. Zimmermann, and Horst Feldmann. TKL2, a second transketolase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 217:487–492, 1993.
- [234] Michael Sundström, Ylva Lindqvist, Gunter Schneidert, Ulf Hellman, and Hans Ronne. Yeast TKL1 gene encodes a transketolase that is required for efficient glycolysis and biosynthesis of aromatic amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32):24346–24352, 1993.
- [235] Ine Schaaff-Gerstenschläger and Friedrich K. Zimmermann. Pentose-phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of deletion mutants for transketolase, transaldolase, and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Current Genetics*, 24(5):373–376, 1993.
- [236] A. T. Carter, F. Beiche, B. Hove-Jensen, A. Narbad, P. J. Barker, L. M. Schweizer, and M. Schweizer. PRS1 is a key member of the gene family encoding phosphoribosylpyrophosphate synthetase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics*, 254(2):148–156, 1997.

- [237] Yolanda Hernando, Adrian Parr, and Michael Schweizer. PRS5, the fifth member of the phosphoribosyl pyrophosphate synthetase gene family in *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for cell viability in the absence of either PRS1 or PRS3. *Journal of Bacteriology*, 180(23):6404–6407, 1998.
- [238] Ke Wang, Stefano Vavassori, Lilian M. Schweizer, and Michael Schweizer. Impaired PRPP-synthesizing capacity compromises cell integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 150(10):3327–3339, 2004.
- [239] Arnaud Lagorce, Nicole C Hauser, Delphine Labourdette, Cristina Rodriguez, Helene Martin-Yken, Javier Arroyo, Jörg D Hoheisel, and Jean François. Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 278(22):20345–20357, 2003.
- [240] Raúl García, Clara Bermejo, Cecilia Grau, Rosa Pérez, Jose Manuel Rodríguez-Peña, Jean Francois, César Nombela, and Javier Arroyo. The Global Transcriptional Response to Transient Cell Wall Damage in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Regulation by the Cell Integrity Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15):15183–15195, 2004.
- [241] Byung-Kwan Cho, Stephen Federowicz, Young-Seoub Park, Karsten Zengler, and Bernhard ØPalsson. Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino acid metabolism. *Nature Chemical Biology*, 8(1):65–71, 2011.
- [242] J.Y. Sze, M. Woontner, J.A. Jaehning, and G.B. Kohlhaw. In vitro transcriptional activation by a metabolic intermediate: activation by Leu3 depends on alpha-isopropylmalate. *Science*, 258(5085):1143–1145, 1992.
- [243] J.E. Marczak and M.C. Brandriss. Analysis of constitutive and noninducible mutations of the PUT3 transcriptional activator. *Molecular and Cellular Biology*, 11(5):2609–2611, 1991.
- [244] L S Jefferson and S R Kimball. Amino acid regulation of gene expression. *The Journal of nutrition*, 131(9 Suppl):2460S–6S; discussion 2486S–7S, 2001.
- [245] Yashpal Rawal, Hongfang Qiu, and Alan G. Hinnebusch. Accumulation of a Threonine Biosynthetic Intermediate Attenuates General Amino Acid Control by Accelerating Degradation of Gcn4 via Pho85 and Cdk8. *PLoS Genetics*, 10(7), 2014.
- [246] Jessica L. Yecies and Brendan D. Manning. Transcriptional control of cellular metabolism by mTOR signaling. *Cancer Research*, 71(8):2815–2820, 2011.
- [247] Mi Nam Lee, Sang Hoon Ha, Jaeyoon Kim, Ara Koh, Chang Sup Lee, Jung Hwan Kim, Hyeona Jeon, Do-Hyung Kim, Pann-Ghill Suh, and Sung Ho Ryu. Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Molecular and cellular biology*, 29(14):3991–4001, 2009.
- [248] Daniele Stracka, Szymon Jozefczuk, Florian Rudroff, Uwe Sauer, and Michael N Hall. Nitrogen Source Activates TOR Complex 1 via Glutamine and Independently of Gtr/Rag. *The Journal of biological chemistry*, 289(36):0–19, 2014.

- [249] Michael Ciriacy and Ingrid Breitenbach. Physiological Effects of Seven Different Blocks in Glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 139(1):152–160, 1979.
- [250] Mohammed T. Alam, Michael Mülleler, Aleksej Zelezniak, Pavel Shliaha, Roland Schwarz, Floriana Capuano, Jakob Vowinkel, Elahe Radmanesfahar, Antje Krueger, Enrica Calvani, Steve Michel, Stefan Börno, Stefan Christen, Kiran R. Patil, Bernd Timmermann, Kathryn S. Lilley, and Markus Ralser. Combinatorial metabolic perturbation triggers system-wide epistasis on transcriptome, proteome and metabolome (currently under Review. 2015.
- [251] Chen Shan Chin, Victor Chubukov, Emmitt R. Jolly, Joe DeRisi, and Hao Li. Dynamics and design principles of a basic regulatory architecture controlling metabolic pathways. *PLoS Biology*, 6(6):1343–1356, 2008.
- [252] Jürgen J. Heinisch, Susanne Müller, Elke Schlüter, Jörg Jacoby, and Rosaura Rodicio. Investigation of two yeast genes encoding putative isoenzymes of phosphoglycerate mutase. *Yeast*, 14(3):203–213, 1998.
- [253] Christoph Wittmann, Michael Hans, Wouter a. Van Winden, Cor Ras, and Joseph J. Heijnen. Dynamics of intracellular metabolites of glycolysis and TCA cycle during cell-cycle-related oscillation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(7):839–847, 2005.
- [254] Eckhard Boles, C P Hollenberg, J J Heinisch, Frank Schulte, Thomas Miosga, Kerstin Freidel, and Elke Schlu. Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to Fructose-1,6-Bisphosphate. *Journal of Bacteriology*, 179(9):2–9, 1997.
- [255] J.J. Mercado, O. Vincent, and J.M. Gancedo. Regions in the promotor of the yeast FBP1 gene implicated in catabolite repression may bind the product of the regulatory gene MIG1. *FEBS Letters*, 291(1):97–100, 1991.
- [256] I Georis, J J Krijger, K D Breunig, and J Vandenhaute. Differences in regulation of yeast gluconeogenesis revealed by Cat8p-independent activation of PCK1 and FBP1 genes in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular & General Genetics*, 264(1-2):193–203, 2000.
- [257] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. Biochemistry (5th Edition). In *Biochemistry*, chapter 16.2 The G. 2002.
- [258] A. Rodriguez, T. de la Cera, P. Herrero, and F. Moreno. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 355(3):625–631, 2001.
- [259] G. P. Pescarmona, A. Bracone, O. David, M. L. Sartori, and A. Bosia. Regulation of NAD and NADP synthesis in human red cell. *Acta Biologica et Medica Germanica*, 36(5-6):759–763, 1977.
- [260] Karyl I. Minard and Lee McAlister-Henn. Sources of NADPH in yeast vary with carbon source. *Journal of Biological Chemistry*, 280(48):39890–39896, 2005.

- [261] Eckhard Boles, Patricia De Jong-Gubbels, and Jack T. Pronk. Identification and Characterization of MAE1 , the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme Identification and Characterization of MAE1 , the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. *Journal of Bacteriology*, 180(11):2875–2882, 1998.
- [262] Qishi Du, Dongqing Wei, and Kuo-Chen Chou. Correlations of amino acids in proteins. *Peptides*, 24(12):1863–1869, 2003.
- [263] S P Butcher, R Bullock, D I Graham, and J McCulloch. Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 21(12):1727–1733, 1990.
- [264] A. Ghosh and B. Chance. Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 16(2):174–81, 1964.
- [265] B. Chance, A. Ghosh, J.J. Higgins, and P. K. Maitra. Cyclic and oscillatory responses of metabolic pathways involving chemical feedback and their computer representations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 115:1010–1024, 1964.
- [266] M. A. Hans, E. Heinzle, and C. Wittmann. Free intracellular amino acid pools during autonomous oscillations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering*, 82(2):143–151, 2003.
- [267] Min Hyun Kim and Hyeyoung Kim. Oncogenes and Tumor Suppressors Regulate Glutamine Metabolism in Cancer Cells. *Journal of Cancer Prevention*, 18(3), 2013.
- [268] Ling Li, Melissa a Fath, Peter M Scarbrough, Walter H Watson, and Douglas R Spitz. Combined inhibition of glycolysis , the pentose cycle , and thioredoxin metabolism selectively increases cytotoxicity and oxidative stress in human breast and prostate cancer. *Redox Biology*, 4:127–135, 2015.
- [269] Sybille Mazurek, Erich Eigenbrodt, Klaus Failing, and Pablo Steinberg. Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathways after malignant transformation of rat liver oval cells. *Journal of Cellular Physiology*, 181(1):136–146, 1999.
- [270] Mohit Jain, Roland Nilsson, Sonia Sharma, Nikhil Madhusudhan, Toshimori Kitami, Amanda L. Souza, Ran Kafri, Marc W Kirschner, Clary B. Clish, and Vamsi K Mootha. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336(6084):1040–1044, 2012.
- [271] Vincent M. Asiago, Leiddy Z. Alvarado, Narasimhamurthy Shanaiah, G. a Nagana Gowda, Kwadwo Owusu-Sarfo, Robert a. Ballas, and Daniel Raftery. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. *Cancer Research*, 70(21):8309–8318, 2010.
- [272] Wolfgang Leuchtenberger, Klaus Huthmacher, and Karlheinz Drauz. Biotechnological production of amino acids and derivatives: Current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1):1–8, 2005.

- [273] E. Dewaele, A. Craciun, M. Vauterin, V. Frankard, E. Suharyanto, J. Tadesse, and M. Jacobs. Metabolic engineering of a complex biochemical pathway: The lysine and threonine biosynthesis as an example. *Phytochemistry Reviews*, 1(1):125–133, 2002.
- [274] Ingemar Naerdal, Roman Netzer, Trond E Ellingsen, and Trygve Brautaset. Analysis and Manipulation of Aspartate Pathway Genes for L-Lysine Overproduction from Methanol by *Bacillus methanolicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17):6020–6026, 2011.
- [275] Judith Becker, Corinna Klopprogge, Oskar Zelder, Elmar Heinzle, and Christoph Wittmann. Amplified Expression of Fructose 1,6-Bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* Increases In Vivo Flux through the Pentose Phosphate Pathway and Lysine Production on Different Carbon Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12):8587–8596, 2005.
- [276] Jens Olaf Krömer, Christoph Wittmann, Hartwig Schröder, and Elmar Heinzle. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 8(4):353–369, 2006.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe. Es wurden keine anderen als die zulässigen Hilfsmittel sowie die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen genutzt. Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche gekennzeichnet. Die Zeichnungen, Tabellen, Abbildungen sind von mir selbst erstellt oder mit einem entsprechenden Quellenachweis versehen. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Berlin, den 15. Oktober 2015

Steve Michel