

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. Thomas Gudermann

---

**REGULATION UND KINETIK DES  
GALAKTOSETRANSPORTES  
IN DER HXT NULL MUTANTE RE700  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
Christina Bruness  
aus Löningen

Marburg 2004

Vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: 24.02.2005

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. G. F. Fuhrmann

Korreferent: Prof. Dr. Koolman

*für Florian, Jonathan und Maria*

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Hefen als Untersuchungsobjekt .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Transport von Hexosen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Affinitäten der Glukosetransporter HXT1-4, HXT6-7 und GAL2 .....	5
1.2.2	Das Prinzip der "facilitated diffusion" .....	6
1.2.3	Mögliche Ähnlichkeiten der Substraterkennung im Gal2 bei Hefen und im Glut1 bei tierischen Zellen .....	9
<b>1.3</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>Hefezellstämme und Stammhaltung .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Kultivierung der Hefe und Ernte.....</b>	<b>14</b>
2.2.1	Nährmedien.....	14
2.2.2	Kultivierung der Hefe.....	16
2.2.3	Wachstumsphasen der Hefe .....	16
2.2.4	Ernte.....	17
<b>2.3</b>	<b>Batchkultur mit anschließendem Glukose-shift.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4</b>	<b>Methode der initialen Glukose- und Galaktoseaufnahme .....</b>	<b>18</b>
2.4.1	Vorbereitung .....	19
2.4.1.1	Pufferwaschung.....	19
2.4.1.2	Herstellen der Zuckerlösungen für die Fünf-Sekunden-Aufnahme .....	20
2.4.2	Versuchsablauf der schnellen Fünf-Sekunden-Aufnahmen .....	21
2.4.3	Filterleerwerte .....	21
2.4.4	Auswertung der Meßdaten .....	22
<b>2.5</b>	<b>Efflux- und Gegentransportmessungen in Plasmamembranvesikeln .....</b>	<b>24</b>
2.5.1	Einführung.....	24
2.5.2	Präparation von Plasmamembranvesikeln.....	25
2.5.3	Versuchsablauf.....	28
2.5.3.1	Vorbereitung und Durchführung .....	29
2.5.3.2	Auswertung .....	30
2.5.3.3	Berechnung von $K_m$ nach der Wilbrandtschen Formel.....	31
<b>2.6</b>	<b>Verwendete Geräte und Materialien .....</b>	<b>34</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Versuche mit Plasmamembranvesikeln aus der Nullmutante RE700 mit Galaktose-Induktion.....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Galaktose-Gegentransport und Galaktose-Efflux an Plasmamembranvesikeln, präpariert aus der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion.....	35
3.1.2	Glukose-Gegentransport und Glukose-Efflux an Plasmamembranvesikeln, präpariert aus der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion .....	37
3.1.3	Glukose-Gegentransport und Glukose-Efflux an Plasmamembranvesikeln, präpariert aus der Nullmutante RE700 ohne Galaktose-Induktion.....	39
<b>3.2</b>	<b>Versuche an intakten Zellen der Nullmutante RE700 mit und ohne Galaktose-Induktion .</b>	<b>40</b>
3.2.1	Initiale Galaktoseaufnahme in Zellen der Nullmutante RE700, die auf Galaktose gewachsen sind (Induktion des Gal2-Transporters) .....	40
3.2.2	Initiale Glukoseaufnahme in Zellen der Nullmutante RE700, auf Galaktose gewachsen .....	41
3.2.3	Initiale Glukoseaufnahme in Zellen der Nullmutante RE700 ohne Galaktose-Induktion.....	43
<b>3.3</b>	<b>Versuche an intakten Zellen des Wildtyps 996A mit Galaktose-Induktion.....</b>	<b>44</b>
3.3.1	Initiale Galaktoseaufnahme in Zellen des Wildtyps 996A auf Galaktose gewachsen ....	44
<b>3.4</b>	<b>"Shiftversuche" von Galaktose nach Glukose am Wildtyp MC996A und an der Nullmutante RE700.....</b>	<b>46</b>
3.4.1	Initiale Galaktoseaufnahme nach "Glukoseshift" der Zellen des Wildtyps 996A.....	47
3.4.2	Initiale Galaktoseaufnahme nach "Glukoseshift" an den Zellen der Nullmutante RE700.....	49
3.4.2	Versuchsdauer bis acht Stunden.....	51
3.4.4	Initiale Glukoseaufnahme nach "Glukoseshift" an den Zellen der Nullmutante RE700.....	53
3.4.5	Versuchsdauer bis drei Stunden .....	55
3.4.6	Versuchsdauer bis fünf Stunden.....	56
<b>3.5</b>	<b>Zusammenfassung und Vergleich von <math>V_{max}</math>- und <math>K_m</math>-Werten aus den initialen Aufnahmeversuchen am Wildtyp 996A und an der Nullmutante RE700 mit Glaktose oder Glukose als Substrat.....</b>	<b>58</b>
3.5.1	Zusammenfassung aller $V_{max}$ -Werte nach „Glukoseshift“ .....	58
3.5.2	Zusammenfassung der $K_m$ -Werte .....	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>

<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>76</b>
<b>7.1</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>76</b>
<b>7.2</b>	<b>Akademische Lehrer</b> .....	<b>78</b>
<b>7.3</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>79</b>
<b>7.4</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>80</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hefen als Untersuchungsobjekt

Die gemeine Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zum Organisationstyp der Pilze. Durch die industrielle Anwendung sind sie und ihre Arten die bekannteste und am besten untersuchte Hefe. Verwendet wird sie u.a. bei der Bierherstellung (Ethanolproduktion), beim Backen oder auch als Nahrungsmittelergänzung (reich an Protein und Vitamin B). Sie wird in ihrer Struktur und Funktion den eukaryontischen Zellen zugeordnet. Durch den eukaryonten Charakter der Zellen konnten bereits viele Entdeckungen auf die menschlichen Zellen übertragen werden, z. B. wurden die Schritte der Glykolyse und Gärung zuerst bei *Saccharomyces cerevisiae* aufgedeckt.

Ihr DNA-Gehalt ist allerdings relativ gering, weshalb sie in diesem Punkt eher den Prokaryonten gleicht. Die Hefe ist ein beliebtes Objekt zur Erforschung metabolischer und zytologischer Fragen, da ihr kleines haploides Genom die Mutanten-Herstellung begünstigt und sie als Einzeller in der Anzucht anspruchslos und leicht zu handhaben ist. Hefezellen sind von einer Plasmamembran umgeben, die aus einer doppelten Schicht aneinander gereihter Phospholipidmoleküle besteht. Sie ist nahezu undurchlässig für hydrophile Moleküle wie Kohlenhydrate. Die Kohlenhydrate Glukose, Fruktose und Mannose sind die Hauptenergiequelle der Zelle, ebenso sind sie auch Ausgangsstoff für den Aufbau anderer lebensnotwendiger Substanzen. In der gemeinen Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* fungieren sie als Brennstoff, Energiespeicher, Stoffwechselzwischenprodukte und außerdem sind sie ein wichtiger Bestandteil der Zellwand.

Seit langer Zeit ist der Zucker Galaktose wegen seiner induktiven Effekte bei *Saccharomyces cerevisiae* von besonderem Interesse. Die Anwesenheit von Galaktose im Medium bewirkt, dass das GAL2 Gen einen Galaktosetransporter, die Galaktosepermease Gal2, kodiert. Da es für Galaktose im Zellinneren im uninduzierten Zustand keine katabolen Stoffwechselwege gibt, müssen bei der Induktion drei Gene

kodiert werden, deren Produkte Galaktose in Glukose-1-phosphat umwandeln. Das erste Enzym, die Galaktokinase (Gal1), phosphoryliert Galaktose zu Galaktose-1-phosphat. Diese phosphorylierte Galaktose übernimmt dann eine Uridylgruppe von Uridindiphosphat-Glukose durch die Galaktose-1-phosphat-Uridyl-Transferase (Gal7). Die Galaktoseeinheit der UDP-Galaktose wird darauf zu Glukose epimerisiert, dabei wird die Hydroxylgruppe der Galaktose am C-4 durch die UDP-Galaktose-4-Epimerase (Gal10) umgekehrt. Die Summe der Reaktionen, die von Galaktokinase, Transferase und Epimerase (Leloir-Enzyme) katalysiert werden, ist:



Die Expression der 4 Gene GAL1, GAL2, GAL4 und GAL10 erfolgt koordiniert und unterliegt im Wesentlichen zwei Kontrollmechanismen [Lagunas93] [Boles97] [Özcan99]. Die Anwesenheit von Galaktose bewirkt die oben beschriebene Induktion während Glukose den gegenteiligen Effekt, eine Repression der Enzyme hervorruft. Bei der Repression werden die Leloir-Enzyme irreversibel katabolisch abgebaut, wahrscheinlich durch Proteolyse. Dieses Phänomen wurde 1976 von Holzer als Katabolitinaktivierung bezeichnet [Holzer76]. Durch Glukose induziert wird der Transporter Gal2 durch Endozytose internalisiert und in der Vakuole abgebaut [Horak97].

Die Induktion und Repression der Funktionsproteine ist sehr komplex, sie wird von sogenannten Signal-Genen (GAL3, GAL4, GAL80) gesteuert. Bei der Galaktose-Induktion kodiert das Gen GAL4 einen Aktivator für die Transkription der GAL Gene (GAL1, GAL2, GAL7 und GAL10). In nichtinduzierten Zellen verhindert das Produkt eines anderen Gens, das GAL80 Gen, diese Aktivierung durch GAL4. In induzierten Zellen dagegen kodiert ein weiteres Gen GAL3 ein Protein, das die Aktivierung von GAL80 ausschaltet. Dabei ist das Gal3 Protein ähnlich der Galaktokinase (Gal1), es bindet wie diese ATP-abhängig Galaktose, ohne jedoch eine nachweisbare Galaktokinase-Aktivität zu besitzen und inhibiert in dieser Form GAL80. Diese



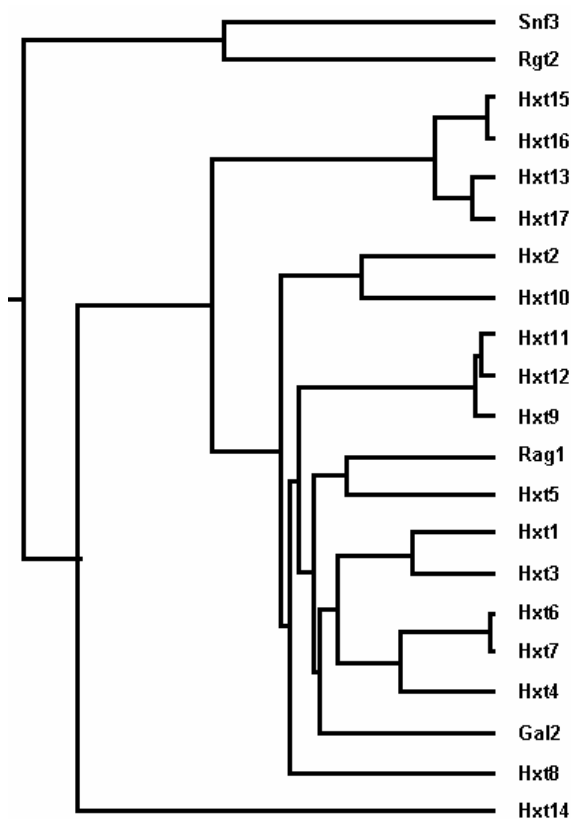
Hemmung aktiviert wiederum die Transkription der GAL Gene. Darüber hinaus scheint es noch weitere Signal GAL Gene mit bisher noch unbekannter Funktion zu geben.

Repression von Transkription durch Glukose ist ein verbreiteter Kontrollmechanismus, der nicht nur die GAL Gene, sondern auch viele andere Gene verschiedener Stoffwechselwege beeinflusst. Der Mechanismus wurde besonders beim SUC2 Gen untersucht, welches das Enzym Invertase kodiert. Komplexer gestaltet sich die Regulation der GAL Gene. Die Anwesenheit von Glukose schaltet den induktiven Effekt von Galaktose aus. Eine ganz wesentliche Rolle spielt dabei die Hemmung des GAL4 Aktivators. Das MIG1 Gen hat eine Doppelrolle: Auf der eine Seite reduziert es den GAL4 Aktivator und auf der anderen Seite hemmt es direkt die Expression von GAL Genen. Die Tatsache, dass bei Mutanten ohne das MIG1 Gen die Repression nicht vollständig ausgeschaltet ist, wird als Hinweis auf die Existenz weiterer Elemente gewertet.

## 1.2 Transport von Hexosen in *Saccharomyces cerevisiae*

Hefezellen der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* nehmen Glukose nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion auf [Fuhrmann76] [Fuhrmann89(1)] [Maier02]. Die Glukose wird von Carriern transportiert, die alle Mitglieder der “Zuckertransporter-Superfamilie“ sind. Es existiert dabei eine Vielzahl von Genen, die unterschiedliche Hexosetransporter unter bestimmten Bedingungen exprimieren können.

Mittlerweile sind in der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* zwanzig verschiedene Hexosecarrier Gene bekannt. Dazu gehören die Gene HXT1–HXT17 und GAL2, sowie die zwei Glukosesensorgene SNF3 und RGT2 [Kruckeberg96] [Boles97] [Ciriacy97]. In ihrer Funktion als Sensor für extrazelluläre Glukose können letztere ein intrazelluläres Signal für die glukoseinduzierte Transkription der HXT-Gene erzeugen.



**Abbildung 1.2.1:** Kruckeberg 1996, Dendrogramm über die Sequenzgleichheit der Hexosetransporter von *Saccharomyces cerevisiae*

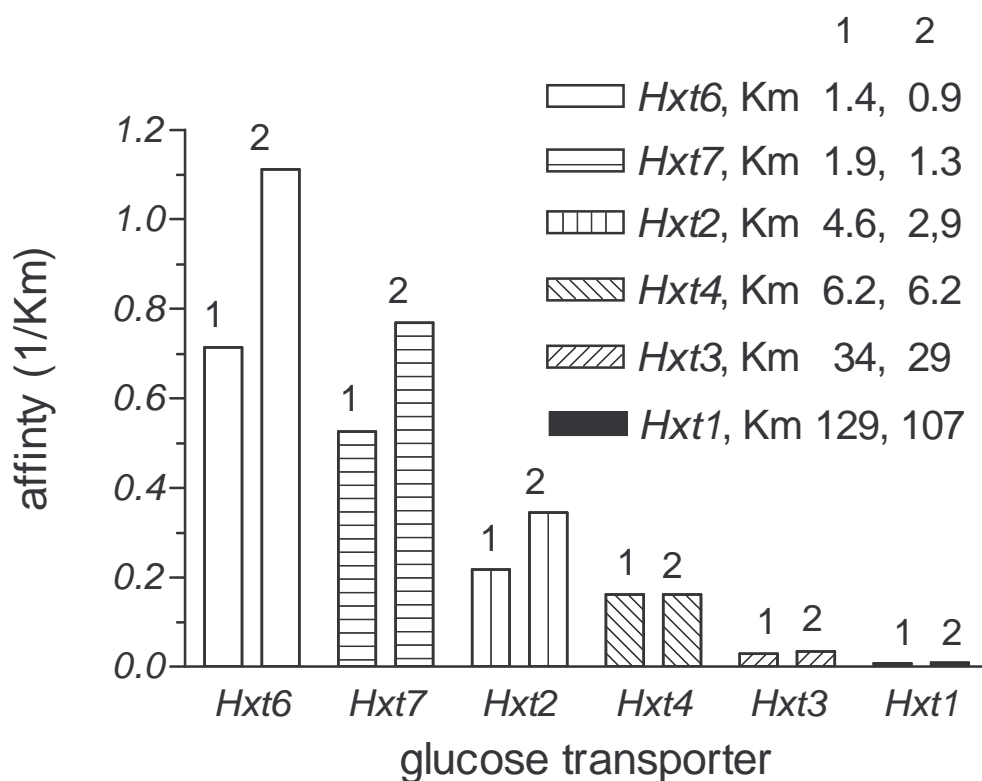
Die Vielzahl von Zuckertransportern stellt die Frage nach dem Nutzen für die Hefezellen. Unter natürlichen Bedingungen müssen die Hefen in der Lage sein, auf hohen Hexosekonzentrationen von 5 M bis zu kleinsten Konzentrationen von weniger als

$10^{-5}$  M effizient zu wachsen. Mit verschiedenen  $K_m$ -Werten und individueller Regulation der einzelnen Hexosetransporter passen sich die Hefen diesen verschiedenen Umweltbedingungen perfekt an. Die kinetischen Eigenschaften können sowohl posttranslationalen Modifikationen unterliegen, also auch Modifikationen durch gegenseitige Interaktion oder mit anderen Proteinen [Kruckeberg96].

Um die Funktion und die Rolle in der Regulation im Zuckerstoffwechsel, sowie die kinetischen Eigenschaften der einzelnen Transporter zu klären, wurden Mutanten hergestellt, die jeweils nur ein Gen oder keines der physiologisch relevanten HXT Transporter Gene besitzen [Reifenberger95].

### 1.2.1 Affinitäten der Glukosetransporter Hxt1-4, Hxt6-7 und Gal2

Andreas Maier hat in seiner Doktorarbeit (2001) kinetisch den Glukosetransport in den physiologisch relevanten Mutanten HXT1, HXT2, HXT3, HXT4, HXT6, HXT7 und GAL2 durch schnelle Aufnahmen in den Zellen und durch Gegentransportversuche in Plasmamembranvesikeln charakterisiert.



**Abbildung 1.2.2:**

Die Balken der Graphik zeigen die Affinität ( $1/K_m$ ) der verschiedenen Glukosetransporter. Die mit 1 gekennzeichneten Balken geben die berechnete Affinität aus Gegentransportversuchen an Plasmamembranvesikeln und unter 2 aus schnellen Aufnahmen an intakten Zellen erhobene Werte wieder. Außerdem sind die jeweiligen  $K_m$ -Werte unter 1 und 2 bei den Kennzeichnungen der Balken angegeben (Werte aus der Doktorarbeit Andreas Maier, 2001).

Wie aus der Abbildung 1.2.2 besonders gut zu erkennen ist, decken die Glukosetransporter nahezu nahtlos durch verschiedene Affinitäten einen großen Glukosekonzentrationsbereich ab. Die  $K_m$ -Werte für den Glukosetransport des Galaktosetransporters Gal2 lagen bei einer hohen Affinität mit einem  $K_m$ -Wert von 1,5 mM sowohl in den Gegentransportversuchen als auch in den initialen Aufnahmeversuchen [Maier01].

### 1.2.2 Das Prinzip der „facilitated diffusion“

Das Phänomen des Gegentransportes wurde zuerst von Rosenberg und Wilbrandt experimentell gezeigt [Rosenberg57]. Nach Modellvorstellungen erstreckt sich der Carrier quer durch die Lipiddoppelschicht, verbindet sich auf der einen Seite der Membran mit dem diffundierenden Teilchen und lässt es auf der anderen Seite abdissoziieren. Außerdem kann der Carrier „auf dem Rückweg“ wieder ein anderes Teilchen mitnehmen, so dass auch verschiedene Zucker in die jeweils entgegengesetzte Richtung transportiert werden können. Der Konzentrationsgradient eines affinen Zuckers treibt dabei einen zweiten affinen Zucker aus dem Gleichgewicht; es erfolgt ein Transport entgegen dem Konzentrationsgefälle (Gegentransport). Der Gegentransport funktioniert auch mit einer radioaktiv markierten und einer unmarkierten Form von Substraten der gleichen Molekularstruktur und wird als Iso-Gegentransport bezeichnet [Wilbrandt61]. Die Substrate werden also energieunabhängig entlang eines Konzentrationsgefälles transportiert. Dieser gekoppelte Transport charakterisiert den Transportprozess als sogenannte „facilitated diffusion“. Dieses carriervermittelte Transportsystem weist eine Kinetik nach Michaelis und Menten auf. Die Transportrate ist der Substratkonzentration proportional, d. h. nach Sättigung eines Transporters erreicht sie ihren Maximalwert. Dieser Maximalwert kann auch bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration nicht überschritten werden (maximale Transportgeschwindigkeit  $V_{\max}$ ). Für verschiedene Substrate existieren spezifische Carrier. Eine Ausnahme hierbei bildet der Gal2 Transporter in Hefen, sowie der Glut1 Transporter in tierischen Zellen, die sowohl Galaktose als auch Glukose und andere Zucker transportieren können.

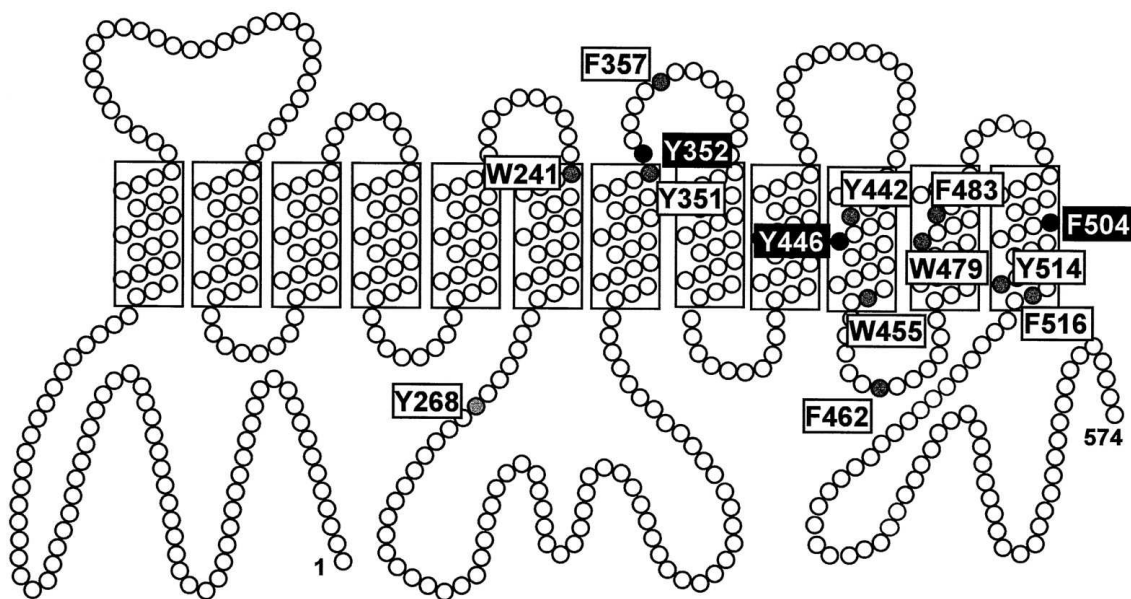
### 1.2.3 Mögliche Ähnlichkeiten der Substraterkennung im Gal2 bei Hefen und im Glut1 bei tierischen Zellen

Obwohl zum Beispiel die Aminosäuresequenz des hochaffinen Glukosetransporters Hxt2 zu 70% mit der Aminosäuresequenz des ebenfalls hochaffinen Galaktosetransporters Gal2 übereinstimmt, transportiert Hxt2 nur Glukose, Gal2 hingegen Glukose und Galaktose [Bisson93] [Nishizawa95].

Für den Galaktosetransporter Gal2 der Hefe scheinen die aromatischen Aminosäuren Tyr<sup>446</sup> und Trp<sup>455</sup> im transmembranen Segment 10 (TM10) wichtig für die Galaktoseerkennung zu sein [Kasahara96] [Nishizawa95] [Kasahara97]. Das fanden Kasahara et al. heraus, indem sie mit Hilfe von galaktosehaltigen Agarplatten 19 verschiedene Galaktosetransport positive Mutanten herstellten, die alle Tyr<sup>446</sup> an entsprechender Stelle wie Gal2 enthielten [Kasahara97]. Bei Versuchen Tyr<sup>446</sup> durch eine der anderen 19 Aminosäuren zu ersetzen, verschwand die Transportaktivität des resultierenden Transporters. Ebenso reduzierte sich die Transportaktivität bei Wechsel von Trp<sup>455</sup> gegen eine andere der 19 Aminosäuren von 0 bis auf <20% dessen, was der Wildtyp-Galaktosetransporter Gal2 aufweist [Kasahara/Maeda98].

Ein Austausch der korrespondierenden Aminosäuren Phe<sup>431</sup> und Tyr<sup>440</sup> von Hxt2 mit Tyr<sup>446</sup> und Trp<sup>455</sup> ergab, dass der Glukosetransporter Hxt2 nun in der Lage war, wie Gal2 auch Galaktose zu transportieren.

Um die Rolle der aromatischen Aminosäuren für den Zuckertransport bei anderen Mitgliedern der Zuckertransporterfamilie zu untersuchen, wurde mit Hilfe der DOMO Datenbank nach den Positionen gesucht für aromatische Aminosäuren, die in Zuckertransportern und verwandten Proteinen zu finden sind. Vierzehn solcher Positionen enthalten eine aromatische Aminosäure in mehr als 75% der 63 gelisteten Proteine. Jede einzelne dieser Positionen konnte gezielt durch „random site-directed mutation“ und Selektion der galaktosetransport-positiven Klone untersucht werden. Das Ergebnis waren drei Aminosäurepositionen innerhalb des Galaktosetransporters Gal2, die ausschlaggebend für den Galaktosetransport sind [Kasahara00(1)]. Es handelt sich um Tyr<sup>352</sup> auf dem extrazellulär gelegenen transmembranen Abschnitt 7, um Tyr<sup>446</sup> in der Mitte von TM10 und um Ph<sup>504</sup> in der Mitte von TM12 gelegen.



**Abbildung 1.2.3:**

Die Struktur von Gal2 basiert auf einem Modell von zwölf transmembranen Segmenten [Baldwin93].

Dargestellt sind nach Kasahara et al. vierzehn Aminosäurepositionen im Gal2-Transporter, die eine aromatische Aminosäure in mehr als 75% der 63 untersuchten Proteine (DOMO-Datenbank, DM0035, Bezeichnung im Einbuchstabenkode) enthalten [Kasahara00(1)].

Die kritischen Aminosäuren Tyr<sup>352</sup>, Tyr<sup>446</sup> und Phe<sup>504</sup> sind in schwarzen, die anderen elf in weißen Kästchen dargestellt.

Der Glukosetransporter Glut1 tierischer Zellen gehört zur gleichen Glukosetransporterfamilie wie auch Gal2 in Hefezellen. Er transportiert wie der Gal2 Transporter sowohl Galaktose als auch Glukose. Deshalb erwartete man bei diesem Transporter eine ähnliche Art der Substraterkennung wie beim Gal2. Der Molekularmechanismus des Zuckertransportes ist besonders bei Glut1 intensiv durch Austausch verschiedener Aminosäuren in der Sequenz der Transporter untersucht worden. Es stellte sich heraus, dass bei Austausch bestimmter Aminosäuren die Glukosetransportgeschwindigkeit ganz oder teilweise abnahm, sowie sich auch die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Hemmstoffen änderte [Kasahara98].

Um den tierischen Glukosetransporter Glut1 und den Galaktosetransporter Gal2 von Hefen zu vergleichen, wurde die Rolle der zwei Aminosäuren Phe<sup>379</sup> und Trp<sup>388</sup> in Glut1 von Ratten untersucht. Diese beiden aromatischen Aminosäuren entsprechen in der Aminosäuresequenz den Positionen von Tyr<sup>446</sup> und Trp<sup>455</sup> im Gal2 (s.o.).

Kasahara et al fanden heraus, dass die Transportaktivität für Glukose des tierischen Glut1 bei Austausch von Trp<sup>388</sup> (entspricht dem Tyr<sup>446</sup> bei Gal2) durch eine der anderen 19 Aminosäuren und Expression der veränderten Transporter in Hefezellen ebenfalls nicht mehr signifikant nachweisbar ist. Auch der Austausch von Phe<sup>379</sup> (Phe<sup>379</sup> entspricht dem Trp<sup>455</sup> bei Gal2) mit anderen Aminosäuren reduziert die Glukose-Transportaktivität auf <25% von der Transportaktivität des Wildtyp-Glut1 [Kasahara98]. Daraus ergibt sich, dass Trp<sup>388</sup> am zytoplasmatischen Ende von TM10 essentiell und Phe<sup>379</sup> wichtig für den hochaffinen Glukosetransport sind. Jedoch konnte kein signifikanter Galaktosetransport in diesem Hefesystem am Glut1 nachgewiesen werden.

Die kinetischen Eigenschaften beider Transporter sind jedoch sehr ähnlich. Der Galaktosetransporter Gal2 der Hefe und der tierische Glukosetransporter Glut1 transportieren Glukose mit einer hohen Affinität. Außerdem bevorzugen Gal2 und Glut1 in Versuchen mit verschiedenen Zuckern eindeutig D-Glukose als Substrat [Kasahara98]. Der Hauptunterschied in der Struktur von Galaktose und Glukose liegt in der Region um C-4. Deswegen ist es wahrscheinlich, dass die beiden aromatischen

Aminosäuren im transmembranen Segment 10 der beiden Transporter Gal2 und Glut1 eine wichtige Rolle in der Erkennung der C-4 Region von Monosacchariden spielen könnten. Seatter et al. haben ähnliche Beobachtungen im TM7 von Glut2/3 und der C1-Position von D-Glukose gemacht [Seatter98].

Bei menschlichen Zellen findet sich Glut1 u.a. in Erythrozyten und ist z.B. wichtig beim Glukosetransport durch epi- oder endotheliale Barrieren, wie der Blut-Hirn-Schranke. Der  $K_m$ -Wert beim menschlichen Glut1 beträgt bei 20°C für Glukose 1,6 mM und für Galaktose 12 mM [Stein90].



### 1.3 Ziel der Arbeit

Das Vorhandensein einer Mutante (RE700A Nullmutante) ohne Glukosetransporter bietet sich gerade dazu an, den Galaktosetransporter Gal2 für den Galaktosetransport an Hefezellen zu untersuchen. Für diese Untersuchungen müssen jedoch erst durch Galaktose-Induktion funktionelle Galaktosetransporter induziert werden. In einer vorausgehenden Doktorarbeit hatte bereits Andreas Maier gezeigt, dass durch Galaktose der Galaktosetransporter Gal2 in der Nullmutante Gal2 induziert werden kann, der Glukose nach dem Mechanismus der „facilitated diffusion“ transportierte [Maier01]. In dieser Arbeit steht jedoch die Kinetik des Galaktosetransportes am Gal2 im Vordergrund. Die genaue Kinetik sollte mit Hilfe von Gegentransportversuchen an präparierten Plasmamembranvesikeln und in sogenannten initialen Aufnahmeversuchen an intakten Zellen der Nullmutante bestimmt werden. Mit dem Gegentransport und der initialen Aufnahme von Galaktose in intakten Zellen besitzt man zwei unabhängige Versuchsansätze, aus denen sich die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte berechnen lassen. Diese Werte zusammen mit den kinetischen Daten für Glukose am Gal2 sind von besonderem Interesse, um sie mit den kinetischen Daten des tierischen Transporters Glut1 zu vergleichen. So könnten möglicherweise die kinetischen Daten des Galaktosetransporters Gal2 von Hefen auf eine funktionelle Verwandtschaft mit dem tierischen Glut1 hinweisen.

Des Weiteren sollte in der Nullmutante die Kinetik der Repression des Galaktosetransporters durch eine sogenannte „Glukoseshift“ im Vergleich zum Wildtyp untersucht werden. Beim Wildtyp wird durch die Anwesenheit von Glukose eine Repression von Enzymen hervorgerufen und die Leloir-Enzyme werden irreversibel katabolisch durch Proteolyse abgebaut. Der Transporter Gal2 selbst wird durch Endozytose internalisiert und in der Vakuole degradiert. Dieser komplizierte Ablauf durch Glukose ist ein verbreiteter Kontrollmechanismus, der nicht nur die GAL Gene, sondern auch viele andere Gene verschiedener Stoffwechselwege beeinflusst. Bei verschiedenen Mutanten wurde bereits festgestellt, dass die Repression nicht vollständig abläuft. Diese Tatsache dient als Hinweis auf die Existenz weiterer Kontrollelemente.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Hefezellstämme & Stammhaltung

Folgende Hefestämme wurden für die vorliegende Arbeit verwendet:

**A. *Saccharomyces cerevisiae* MC996A (Wildtyp)**

*MATa ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC 2 GAL MEL*

Wildtyp: Die Hefezelle besitzt sämtliche natürlicherweise vorhandene Glukosetransporter.

**B. *Saccharomyces cerevisiae* RE700 (Nullmutante)**

*MATa ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC 2 GAL MEL  
hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3*

Nullmutante: Die *hxt1-hxt7*-Nullmutante exprimiert keinen Glukosetransporter.

Die Hefestämme wurden freundlicherweise von Prof. Dr. E. Boles, Institut für Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstrasse 1, 40225 Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

Stammhaltung: Sie erfolgte unter Luftabschluss bei 4°C auf Agarnährböden.

a) Wildtyp:	2% Glukose	b) Nullmutante:	2% Galaktose
	2% Agar-Agar		2% Agar-Agar
	1% Hefeextrakt		1% Hefeextrakt
	1% Pepton		1% Pepton
	Aqua destillata		Aqua destillata

Die einzelnen Bestandteile wurden autoklaviert und anschließend in Petrischalen gegossen. Die durch Abkühlen fest gewordenen Nährböden stellt man zur Aufbewahrung in den Kühlraum.

Anschließend überimpft man die Hefezellen mit einer Impföse unter möglichst sterilen Bedingungen auf eine Agarplatte. Im Anschluss daran müssen die Platten mit Parafilm

luftdicht verschlossen und bei ca. 30°C mindestens 24-48 Stunden inkubiert werden, bis sich die Zellen ausreichend vermehrt haben.

Eine Verunreinigung der Platten wird dadurch vermieden, dass in regelmäßigen Abständen Hefezellen auf neue Agarplatten übertragen und inkubiert werden.

Um einzelne Hefekolonien zu erhalten, streicht man die frisch gezüchteten Hefen der Nullmutante auf neuen Galaktose-Agarböden dünn aus. Die nach einiger Zeit gewachsenen Kolonien werden mit Zahlen markiert.

Um die Möglichkeit einer Rückmutation des HXT0-Stammes bezüglich der ausgeschalteten Glukosecarrier auszuschließen, streicht man die nummerierten Kolonien auf einer ebenfalls nummerierten Glukose-Agarplatte neu aus. Am ausbleibenden Wachstum der Hefezellen kann eine Rückmutation der jeweiligen Kolonie ausgeschlossen und diese für die Versuche verwendet werden.



Damit sich zu Beginn der Anzucht alle Hefezellen in der gleichen Wachstumsphase befinden, erfolgt zunächst eine Anzucht in Vorkulturen zu je 250 ml. Alle Vorkulturen haben die gleiche Zusammensetzung. Den Vorkulturen für die Nullmutante RE700A werden statt Glukose Galaktose zugegeben. In Vorversuchen zeigt sich, dass allen Vor- und Hauptkulturen von MC996A und der Mutante RE700A zusätzlich 50 µg/ml Uracil zugegeben werden muss, da sonst das Wachstum gehemmt ist.

Um eine Karamellisierung zu vermeiden, wird die Kohlenstoffquelle getrennt vom Hefeextrakt-Pepton-Gemisch autoklaviert. Sie wird erst zu Beginn der Anzucht unter sterilen Bedingungen zum Hefeextrakt-Pepton Gemisch dazugegeben.

In das jeweilige Nährmedium überimpft man mit einer ausgeglühten Impföse jeweils eine einzige Hefezellkolonie, anschließend werden die Kolben mit Alufolie verschlossen und für etwa 36 Stunden bei 30°C in den Schüttler gestellt.

Die Zellen werden solange gezüchtet, bis sie die stationäre Phase von mehr als  $2 \cdot 10^8$  Zellen/ml (per definitionem nach drei Tagen) erreicht haben. Diese Zellen werden zur Anzucht verwendet.

Die Zellzahlen können mittels einer Thoma-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (40 fache Vergrößerung) ausgezählt und gleichzeitig auf bakterielle Kontamination überprüft werden. Zu den Vorkulturen gibt man dann Ampicillin (10 µg/ 100 ml), um bakterielles Wachstum zu verhindern.

### 2.2.2 Kultivierung der Hefen

Die Anzucht der Hauptkultur erfolgt dann als Batch-Kultur in einem 6 l-Zweihalskolben im Warmwasserbad von 30°C. Allen Hauptkulturen wird ebenfalls 50 ng/ml Uracil zugegeben. Die Hauptkultur belüftet man mit gefilterter (Glasfaserfilter) Luft über zwei Glasfritten, um das aerobe Wachstum der Hefe sicherzustellen. Um ein Schäumen der Kultur zu vermeiden, werden einer 6 l-Kultur 2 ml (bei Bedarf auch mehr) einer 5%igen Polypropylynglycollösung zugesetzt. Je nach Erntezeitpunkt der Vorkultur impft man mit verschieden hohen Zelltitern an, höchstens jedoch mit  $1 \cdot 10^7$  Zellen/ml.

In regelmäßigen Abständen werden unter sterilen Bedingungen mit einer Glaspipette Proben aus der Hauptkultur entnommen, der Zelltiter mittels Thoma-Zählkammer bestimmt und Verunreinigungen der Kultur ausgeschlossen.

### 2.2.3 Wachstumsphasen der Hefen

Nach Beimpfen der Hauptkultur benötigen die Hefezellen erst eine gewisse Zeit, bevor sie mit ihrem Wachstum beginnen, diese Phase nennt man die „lag-Phase“. An diese Phase schließt sich das exponentielle Wachstum der Zellen an: die „exponentielle Phase“. Diese kann in eine frühexponentielle, eine mittelexponentielle und eine spätexponentielle Phase unterteilt werden. Nachdem das Nährsubstrat aufgebraucht ist, gehen die Zellen in die „stationäre Phase“ über. In der frühen stationären Phase kann den Hefezellen das während der Zeit des Substratüberangebots aus einem Teil der bereitgestellten Glucose fermentierte Ethanol wieder als Energielieferant zur Verfügung stehen. Nach einer kurzen Übergangszeit sind sie in der Lage, das Ethanol zu metabolisieren und treten dann nochmals in eine kurze Wachstumsphase ein.

lag-Phase:	Zellzahl bleibt unverändert- Dauer etwa zwei Stunden
früh-exponentielle Phase:	$2\text{-}3 \cdot 10^7$ Zellen/ml
mittel-exponentielle Phase:	$4\text{-}5 \cdot 10^7$ Zellen/ml
früh-stationäre Phase:	$1\text{-}2 \cdot 10^8$ Zellen/ml
stationäre Phase:	$2 \cdot 10^8$ Zellen/ml
spät-stationäre Phase:	nach drei Tagen; das Hefewachstum sistiert endgültig

Um gleiche Ausgangsbedingungen bei den Messungen zu gewährleisten, werden die Zellen geerntet, bevor sie in die stationäre Phase eintreten, also in der mittel- bis spätexponentiellen Phase. Diese Phase entspricht einem Zelltitern von  $4\text{-}9 \cdot 10^7$  Zellen/ml.

#### **2.2.4 Ernte**

Die Ernte erfolgt dann in der spät-exponentiellen Phase bei Zelltitern um  $6\text{-}9 \cdot 10^7$  Zellen/ml durch zehnmütiges Abzentrifugieren bei 10400 g (8000 rpm, Sorvall GSA). Das Pellet wird noch zweimal in 250 ml Bechern mit eiskaltem Aqua bidestillata gewaschen, nachdem der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert wurde. Die Aufbewahrung erfolgt auf Eis, um ein erneutes Wachstum zu verhindern.

## 2.3 Batchkultur mit anschließendem Glukoseshift

Nachdem die Batch-Kultur mit Galaktose/Maltose für die Nullmutante RE700 und mit Glukose als Kohlenstoffquelle für den Wildtyp genügend hochgewachsen ist, erfolgt die Ernte von 1,5 l Kultur der insgesamt 6 l Kultur. Die geernteten Zellen werden wie oben beschrieben gewaschen.

Der Rest der Kultur kann dann mit 5% Glukose im Hefeextrakt-Pepton Medium beimpft und jeweils zu bestimmten Zeitpunkten 1-1,5 l (je nach benötigter Zellmenge) geerntet und gewaschen werden.

Nach dem Waschen folgt das Einstellen des Zytokrits auf 10%. Hierzu werden zwei verschweißte Messkapillaren für fünf Minuten bei 13250 g in der Biofuge (13000 rpm, Heraeus Christ) gegeben. Anschließend wird der Zytokrit mittels einer Schablone bestimmt.

## 2.4 Methode der initialen Glukoseaufnahme/Galaktoseaufnahme

Der Nettotransport (Nettoflux) von Glukose durch einen Transporter der Zellmembran errechnet sich aus der Differenz von Einwärtsstrom (Influx) und Auswärtsstrom (Efflux):

$$\boxed{\text{Nettoflux} = \text{Influx} - \text{Efflux}}$$

Nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen radioaktiv markierter Glukose hemmt man die Glukoseaufnahme nach 5 Sekunden fast vollständig durch Zugabe von eiskalter Sorbitollösung. Da ein selektiver Hemmstoff des Glukosetransports bei Hefezellen nicht bekannt ist, kann man den Transport nicht vollständig hemmen. Das „Abstoppen“ des Glukosetransportes erfolgt durch den Temperatursprung von 25°C auf Eisbadtemperatur und das Verdünnen der Hefesuspension mit 10 ml Sorbitollösung. Sorbitol soll dabei die unspezifische Adsorption von Glukose an Hefezellen und Glasfaserfilter verdrängen. Der während des nun folgenden Waschens mit eiskaltem Aqua bidestillata verbleibende



Resttransport kann als vernachlässigbar klein angesehen werden. Die in den Hefezellen vorhandene Glukose kann danach über die Messung der vorhandenen Radioaktivität rechnerisch bestimmt werden. Die Überlegung hinter dieser Versuchsdurchführung ist die Annahme, dass die Aufnahmedauer für Glukose mit 5 Sekunden so kurz angesetzt ist, dass keine signifikant hohe Glukoseinnenkonzentration erreicht werden kann, welche einen Efflux von Glukose bewirken würde (Modell des Influx mittels Michaelis-Menten-Kinetik). So kann man davon ausgehen, dass man die initiale Geschwindigkeit der Glukoseaufnahme gemessen hat.

Da die Methode für die initiale Glukoseaufnahme und die der initialen Galaktoseaufnahme prinzipiell die gleiche ist, wird sie an dieser Stelle zusammen abgehandelt. Auf Unterschiede wird hingewiesen.

## 2.4.1 Vorbereitung

### 2.4.1.1 Pufferwaschung (0,1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ bei pH 6,5 )

Zunächst werden zweimal 3 ml der 10% Hefesuspension in abgewogene Reagenzgläser gefüllt und diese auf 10 ml mit dem Puffer aufgefüllt und fünf Minuten bei 2500 g (4000 rpm, Beckmann GPR) bei 4°C zentrifugiert. Dieses Vorgehen wird nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets noch zweimal wiederholt und anschließend der Zytokrit auf 10% in 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  bei pH 6,5 eingestellt, d.h. man füllt die Röhrchen (nach Abzug des Röhrchenleergewichts) mit einer Pipette und dem Puffer auf 3 g auf. Die Suspension wird während des gesamten Vorganges möglichst ständig eisgekühlt. Auch die Zentrifugen werden zu Beginn der Waschung vorgekühlt. Für die Transportmessung legt man unter gelegentlichem Aufschütteln der 10% Suspension (Vortex) jeweils 0,1  $\mu\text{l}$  in Reagenzgläsern vor und stellt sie auf Eis. Kurz vor Versuchsbeginn werden dann die Röhrchen mit der vorgelegten Hefesuspension 2-3 min im Warmwasserbad bei 25°C wieder angewärmt.

#### 2.4.1.2 Herstellen der Zuckerlösungen für die Fünf-Sekunden Aufnahme

Man stellt die Glucoselösungen mit der doppelten der für den Versuch benötigten molaren Menge her, da im Versuch die Glucoselösung und die Hefezellsuspension 1:1 gemischt werden, und die Glucosekonzentration dann wieder der gewünschten Versuchskonzentration entspricht. Der Anteil der  $^{14}\text{C}$ -Glucose in den Lösungen 1 - 100 mM beträgt 6  $\mu\text{Ci/ml}$ , in den Lösungen 160 - 400 mM beträgt er 12  $\mu\text{Ci/ml}$ .

Es werden acht verschiedene Glukosekonzentrationen für die Glukoseaufnahme und sieben verschiedene Galaktosekonzentrationen für die Galaktoseaufnahme verwendet.

##### Glukosekonzentrationen:

1 ; 2 ; 10 ; 20 ; 40 ; 100 ; 160 ; 200 mM Glukose in 0,1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mit

6  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{14}\text{C}$ -Glukose für die Konzentration 1-100 mM

12  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{14}\text{C}$ -Glukose für die Konzentration 160-200 mM

##### Galaktosekonzentrationen:

2 ; 10 ; 20 ; 40 ; 100 ; 200 ; 400 mM Galaktose in  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  mit

3  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{14}\text{C}$ -Galaktose für die Konzentration 2-100 mM Galaktose in  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

6  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{14}\text{C}$ -Galaktose für die Konzentration 200-400 mM Galaktose in  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

Die radioaktiven Lösungen befinden sich zu Versuchsbeginn im 25°C warmen Wasserbad.

Zum Stoppen der initialen Glukoseaufnahme benötigt man eisgekühlte 200 mM Sorbitollösung. Die Filter werden mit eisgekühltem Aqua bidestillata gespült.

### 2.4.2 Versuchsablauf der schnellen 5s Aufnahmen

Jeweils 100 µl heiße Glukose/Galaktose werden zu 100 µl Hefesuspension zugegeben und kurz auf einem Rüttler aufgeschüttelt. Nach exakt 5 s wird der Transportvorgang mit 10 ml eisgekühlter 0,2 M Sorbitlösung fast vollständig gestoppt und über einen 22 mm Ø Glasfaserfilter (GF 92, Schleicher & Schüll) abgesaugt. Anschließend saugt man zwei weitere Male jeweils 10 ml eiskaltes Aqua bidestillata zum Waschen über den Filter ab, um die außen anhaftende Radioaktivität zu entfernen. Die Filter werden dann in Szintillationsröhrchen gegeben und mit je 5 ml Szintillationsflüssigkeit bedeckt. Nach dreimaligem kräftigen Schütteln (Vortex) im ca. 15 min Abstand wird die Radioaktivität der auf dem Filter haftenden Hefezellen im Beckmann-Counter (Szintillationsspektrometer) in dpm (desintegrations per minute) gemessen.

### 2.4.3 Filterleerwerte

Um auszuschließen, dass ein Teil der freien nicht aufgenommenen Glukose/Galaktose an den Glasfaserfiltern haftet und somit die Werte verfälscht, müssen die Filterleerwerte bestimmt werden. Es werden je 100 µl der unverdünnten radioaktiv markierten Glukose-/Galaktoselösung aller Konzentrationen mit je 10 ml 0,2 M Sorbitollösung versetzt und wie oben abgesaugt. Im Anschluss daran wird der Filter zweimal mit Aqua bidestillata gewaschen. Die Radioaktivität wird im Szintillationsspektrometer bestimmt. Aus den Werten der mehrmaligen Bestimmung pro Glukose-/Galaktosekonzentration wird der Mittelwert errechnet.

Die Flüssigszintillation ist eine sehr gute Methode zum quantitativen Nachweis schwacher radioaktiver  $\beta$ -Strahlung, wie sie von den Isotopen  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$  und  $^{35}\text{S}$  ausgeht. Die Energie der radioaktiven Strahlung dieser Isotope ist so schwach, dass sie schon nach kurzer Wegstrecke vom umgebenden Material absorbiert wird. Eine Messung mit klassischen Detektoren, wie z.B. einem Geigerzähler ist somit nicht möglich. In der Flüssigszintillation setzt man die schwache radioaktive Strahlung mit Hilfe spezieller organischer Verbindungen (Szintillatoren) in Licht um, wobei die Lichtenergie und Menge sich proportional zur radioaktiven Strahlung des zu messenden Stoffes verhalten,

und die Wellenlänge mit ca. 360 - 400 nm so gewählt wird, dass sie von hoch empfindlichen Sensoren (Photomultiplier) registriert werden kann. Es handelt sich hierbei um ein quasi-photometrisches Verfahren.

#### 2.4.4 Auswertung der Messdaten

Der Szintillationszähler liefert nach Auszählung der Filterradoaktivität der Probe die Rohdaten als dpm-Werte („desintegrations per minute“). Hiervon wird der dem Glasfaserfilter entsprechende Filterleerwert (dpm-Filterleerwert) abgezogen. Den erhaltenen dpm-Wert (dpm-Rohdaten) rechnet man in die Aktivität der Probe um.

Die spezifische Aktivität der Messlösungen errechnet sich aus der Aktivität je Glukosemenge.

Da in den Versuchen 10 mg Hefe über den Glasfaserfilter abgesaugt werden (100 µl einer 10%igen Zellsuspension), die Aufnahme aber auf 1mg Hefe berechnet werden muss, fügt man noch den Faktor  $\frac{1}{10}$  ein. Die Geschwindigkeit der Glucoseaufnahme in die Hefe lässt sich dann nach folgender Formel berechnen:

$$v_{[(\text{nmol}/\text{min})/\text{mg}]} = \frac{\text{Aktivität}_{[\text{nCi}]}}{\text{spezif. Aktivität}_{[\text{nCi}/\text{nmol}]}} \times \frac{60 \text{ s}}{\text{Aufnahmezeit}_{[\text{s}]}} \times \frac{1}{10 \text{ mg}} \quad (2-1)$$

Die Aktivität setzt sich zusammen aus  $\frac{\text{DPM} - \text{Filterleerwert}}{2220}$ , da 1 nCi 2220 Zerfällen pro Minute entspricht. Daraus ergibt sich:

$$v_{[(\text{nmol}/\text{min})/\text{mg}]} = \frac{(\text{DPM} - \text{Filterleerwert})_{[\text{nCi}]}}{2220 \times \text{spezif. Aktivität}_{[\text{nCi}/\text{nmol}]}} \times \frac{60 \text{ s}}{\text{Aufnahmezeit}_{[\text{s}]}} \times \frac{1}{10 \text{ mg}} \quad (2-2)$$

Die dpm-Werte werden in nmol Glucose / mg Nassgewicht Hefezellen umgerechnet.

Dies entspricht dann der aufgenommenen Glucose. Bezogen auf die Aufnahme pro Minute erhält man die Aufnahmegeschwindigkeit  $v$  in (nmol/min)/mg.

Die berechnete Aufnahmegeschwindigkeit  $v$  trägt man in einer Grafik gegen die Substratkonzentration  $S$  auf. Die Daten der Substratkonzentration werden dabei auf die

x-Achse gelegt. Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung wurde in dieser Arbeit das Computerprogramm Prism 2.01 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) benutzt.

Da die Anordnung der Messpunkte bei niedrigen Substratkonzentrationen auf einen sättigbaren Transportvorgang hinweist (Michaelis-Menten Kinetik), es aber bei hohen Konzentrationen teilweise zu einem linearen Anstieg kommt (kein sättigbarer Transport), werden die Messreihen wie folgt analysiert:

Michaelis-Menten Term

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} \quad (2-3)$$

Michaelis-Menten Term mit einem gekoppelten Term erster Ordnung

$$v = \frac{V_{\max} \times S}{K_m + S} + K_d \times S \quad (2-4)$$

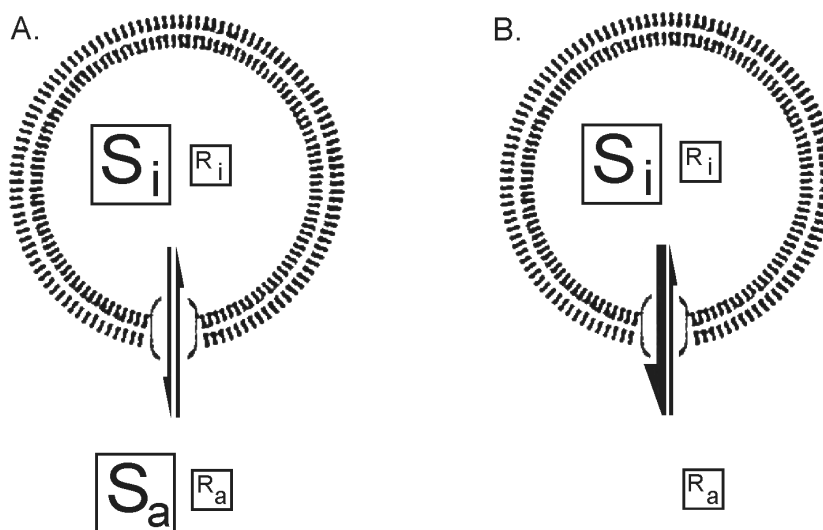
## 2.5 Efflux- und Gegentransportmessung in Plasmamembranvesikeln

### 2.5.1 Einführung

Unter Gegentransport versteht man die Konkurrenz zweier Zucker mit unterschiedlicher Innen- und Außenkonzentration um einen Carrier. Dieses Prinzip wurde 1957 von Rosenberg erstmals experimentell nachgewiesen.

Besitzen beispielsweise zwei sich gleichende Zucker (z.B. mit  $^{14}\text{C}$  markierte D-Glukose und unmarkierte D-Glukose) dieselbe Affinität zum Carrier und werden auch von diesem transportiert, spricht man von Iso-Gegentransport.

In den Versuchen dieser Arbeit werden zwei sich gleichende Zucker verwendet. Es handelt sich um einen „kalten“ nicht radioaktiv markierten Zucker (S) und einen „heißen“ radioaktiv markierten Zucker (R).



**Abbildung 2.2:** Iso-Gegentransport. Anfangs befinden sich die beteiligten Zucker im Gleichgewicht (Bild A.) Nach Start des Versuchs hemmt die hohe Innenkonzentration der unmarkierten Glucose (S<sub>i</sub>) den Auswärtstransport der markierten Glucose (R<sub>i</sub>), so dass es innen zu einer vorübergehenden Akkumulation von markierter Glucose kommt (Bild B.).

Der Efflux des unmarkierten Zuckers ( $S_i$ ) aus der Zelle ist die Triebkraft für den Transport des markierten Zuckers ( $R_i$ ) in die Zelle. Die hohe Konzentration der unmarkierten Glukose innerhalb der Zelle hemmt außerdem den Ausstrom der markierten Glukose. Es kommt zu einer vorübergehenden Akkumulation der markierten Glukose ( $R_i$ ) in der Zelle. Efflux und Influx sind miteinander gekoppelt (Gegentransport). Die Konzentration von  $R_i$  in der Zelle nimmt nach einiger Zeit durch Konzentrationsausgleich und Erschöpfung des Triebgradienten wieder ab.

Durch spezielle Präparationsverfahren können aus Hefezellen Plasmamembranvesikel gewonnen werden. Diese Vesikel bestehen aus den intakten Plasmamembranen der ursprünglichen Hefezellen, jedoch ohne Zellwand und zytoplasmatische Anteile.

Die Methode des Glukose/Galaktose-Gegentransportes und Efflux in Plasmamembranvesikeln wird nach der Methode von Kreutzfeld und Fuhrmann [Kreutzfeld84] durchgeführt.

### 2.5.2 Präparation von Plasmamembranvesikeln

Alle Präparationsschritte wurden im Eisbad durchgeführt (4°C).

#### 1. Lösungen ansetzen:

Präparationspuffer: 100 mM Glycin  
300 mM KCl (pH 7.0)

zusätzlich (für 250 ml Pufferlösung):

360  $\mu$ l 0,1 M PMSF in Methanol  
60  $\mu$ l Pepstatin (3,75 mM in Ethanol)  
900  $\mu$ l EDTA (0,5 M, pH 8,1)

2. Waschen: Die Zellen werden zweimal mit Aqua bidestillata und einmal mit 50 ml Präparationspuffer gewaschen.
3. Schüttelgefäße vorbereiten: 50 g Glasperlen ( $\varnothing$  0,25-0,3 mm)  
x g Hefezellsuspension  
x g Präparationspuffer  
(Hefemenge = Puffermenge; cave: Schüttelgefäße sollten nicht zu leer sein)
4. Homogenisieren: Der Braun-Zell-Homogenisator wird 5 s vorgekühlt und dann die Zellsuspension 55 s bei 4000 rpm unter CO<sub>2</sub>-Kühlung geschüttelt. Anschließend lässt man die Glasperlen kurz absitzen und verteilt dann den Inhalt zu gleichen Teilen auf zwei Zentrifugengläser. Nachfolgend wird das Schüttelgefäß nochmals mit Präparationspuffer ausgewaschen und der Inhalt auf beide Zentrifugationsgefäße verteilt.
5. Zentrifugation: Das Homogenisat wird zweimal zehn Minuten bei 4200 rpm (SS-34-Rotor, Sorvall RC2-B-Zentrifuge) zentrifugiert, die Überstände gesammelt und die Niederschläge (intakte Zellen, Zelltrümmer, Zellkerne) jeweils verworfen.
6. Filtration: Die gesammelten Überstände saugt man über einen Glasmembranfilter (Sartorius SM 13400) ab. Das Filtrat enthält nun noch Membranstücke aus Plasmamembranen, intrazellulären Membranen sowie Mitochondrien.



7. Waschen: Das Filtrat wird jetzt dreimal mit 20 ml Präparationspuffer gewaschen und jeweils 20 min bei 7200 rpm (SS-34-Rotor, Sorvall RC2-B-Zentrifuge) zentrifugiert. Wieder werden die Niederschläge gesammelt. Der erste Überstand wird gesammelt und ein zweites Mal mitzentrifugiert, um eine höhere Ausbeute zu erreichen. Der zweite und dritte Überstand wird verworfen. Die Pellets werden vor dem Zentrifugieren in Präparationspuffer resuspendiert.
8. Aggregieren: Das Pellet der dritten Zentrifugation wird nun in 30 ml frisch angesetztem Präparationspuffer (s.o.) resuspendiert. Die noch vorhandenen Mitochondrien werden durch Titration der Suspension unter Verwendung der Einstellösung (0,2 ml 1 M HCl + 5 ml Präparationspuffer) auf pH 4.5 eingestellt. Jetzt wird ca. fünf Minuten das Aggregieren der Mitochondrien abgewartet.
9. Zentrifugieren: Nun wird 10 min bei 2000 rpm (SS-34-Rotor, Sorvall RC2-B-Zentrifuge) zentrifugiert.
- Ergebnis: Überstand: Vesikel  
Niederschlag: Mitochondrien
10. Filtration: Die Vesikel/Überstand filtrierte man nun dreimal durch einen Glasfaserfilter (200 S, SM 13400, Sartorius) mittels der H<sub>2</sub>O-Pumpe filtrierte.

11. Zentrifugieren&Waschen: Das Filtrat wird 10 min bei 20000 rpm (SS-34-Rotor, Sorvall RC2-B-Zentrifuge) zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das entstandene Pellet wird einmal mit 30 ml 0,4 M KCl resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Das nun gewaschene Pellet wird in 1-2 ml 0.4 M KCl resuspendiert und der Zytokrit mittels einer Glaskapillare und einer Hämatokrit-Zentrifuge bestimmt (10 Minuten bei 13000 rpm). Der Zytokrit wird mit 4.0 M KCl auf 4% eingestellt.

Für die Präparation benötigt man eine große Zellmenge, es empfiehlt sich daher 6 l Kulturen anzusetzen. Die Ernte erfolgt in der mittel- bis spätexponentiellen Phase bei einem Zelltiter von  $4\text{-}6 \cdot 10^7$  Zellen/ml.

### 2.5.3 Versuchsablauf

Äquibrierungslösung: 100 mM unmarkierte Glukose/Galaktose  
1  $\mu\text{Ci/ml}$  markierte D- $^{14}\text{C}$ -Glukose/Galaktose  
in 400 mM KCl (pH 4.5)  
Aqua bidestillata

Treiblösung: 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$  markierte D- $^{14}\text{C}$ -Glukose/Galaktose  
in 400 mM KCl (pH 4.5)  
Aqua bidestillata

Stoplösung: 400 mM KCL (pH 4.5)

### 2.5.3.1 Vorbereitung und Durchführung

Zuerst müssen die Plasmamembranvesikel (PMV) äquilibriert werden, d.h. 700  $\mu\text{l}$  der 4% Vesikelsuspension werden zu 700  $\mu\text{l}$  Äquilibrierungslösung in ein Sorvall-Zentrifugenröhrchen gegeben, vermischt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden dem Ansatz drei 100  $\mu\text{l}$  Proben entnommen und jeweils 5 ml eiskalte Stopplösung (0,4 M KCl) dazugegeben. Diese Lösung wird jeweils über einen Zellulosenitratfilter (0.65  $\mu\text{m}$ , Sartorius) sofort abgesaugt und ein weiteres Mal mit 5 ml Stopplösung nachgespült. Die drei Filter werden je in ein Szintillationsröhrchen mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Im Abstand von einer halben Stunde schüttelt man die Proben dreimal und bestimmt dann die auf den Filtern vorhandene Radioaktivität durch ein Szintillationsspektrometer. Aus diesen Probemesswerten kann nun nach Abzug der Filterleerwerte der Mittelwert gebildet und dieser als Äquilibrierungswert  $R(o)$  für die Auswertung genommen werden.

Übrig bleiben 1100  $\mu\text{l}$  des Ansatzes der bei 48200 g (20000 rpm, Sorvall Zentrifuge ,2234 Rotor) zehn Minuten zentrifugiert wird, damit sich ein PMV-Pellet absetzt. Man pipettiert den Überstand (1070  $\mu\text{l}$ ) ab und stellt die verbleibenden 30  $\mu\text{l}$  mit dem Pellet im Röhrchen auf Eis.

Der Gegentransport beginnt durch Resuspension der Plasmamembranvesikel in 1070  $\mu\text{l}$  Treiblösung bei 4°C im Eisbad. Die gesamten Versuche finden im Eisbad statt, da bei etwa 25°C Raumtemperatur der Gegentransport zu schnell abläuft und nicht mehr messbar wäre.

Für die notwendigen Effluxmessungen ersetzt man die Treiblösung durch 400 mM KCl-Lösung (pH 4.5).

Zu definierten Zeitpunkten t:

tGluk: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30 min

tGal: 45 s, 90s, 135s, 3, 4, 5, 7, 10, 18, 20, 30 min

werden pro Messreihe (Gegentransport und Efflux) 10 Proben zu je 100  $\mu\text{l}$  entnommen und sofort nach Abnahme in 5 ml eiskalte 0,4 M KCl (Stopplösung) pipettiert. Anschließend wird diese Lösung durch den angefeuchteten Nitrozellulosefilter

(Sartorius Porengröße 0,65  $\mu\text{m}$ ) abgesaugt und einmal mit 5 ml eiskaltem 0,4 M KCl (Stopplösung) nachgespült. Die Filter werden wieder in ein Szintillationsröhrchen gegeben, mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit bedeckt und im Abstand von einer halben Stunde dreimal geschüttelt. Zuletzt wird die auf den Filtern vorhandene Radioaktivität durch den Szintillationsspektrometer bestimmt.

### 2.5.3.2 Auswertung

#### **Filterleerwerte**

Genau wie bei der initialen Glucoseaufnahme muss zur exakten Bestimmung der vesikelgebundenen Radioaktivität der nicht vesikelgebundene Anteil, der Filterleerwert, ermittelt werden. Dieser Wert wird dann von den Messwerten der einzelnen Proben abgezogen. Insgesamt sind drei Filterleerwerte (Äquilibrierung, Gegentransport- und Effluxmessung) zu bestimmen. Für jeden Filterleerwert werden fünf Versuche durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

#### a) Äquilibrierungsfilterleerwert:

Für diese Leerwertbestimmung gibt man die einer 100  $\mu\text{l}$  Probe entsprechenden 50  $\mu\text{l}$  Äquilibrierungslösung in 5 ml Stopplösung. Dann wird die Lösung über einen Nitrozellulosefilter abgesaugt, mit 5 ml Stopplösung nachgespült und die Radioaktivität im Szintillationsspektrometer bestimmt.

#### b) Gegentransportfilterleerwert:

Die Messung erfolgt wie unter a) beschrieben. Statt der 50  $\mu\text{l}$  Äquilibrierungslösung nimmt man die einer Probe entsprechenden 100  $\mu\text{l}$  Treiblösung.

#### c) Effluxfilterleerwert:

Als „Effluxlösung“ wird 0,4 M KCl-Lösung (pH 4,5) verwendet. 30  $\mu\text{l}$  Äquilibrierungslösung werden mit 1070  $\mu\text{l}$  0,4 M KCl-Lösung gemischt, und daraus für die Messungen je 100  $\mu\text{l}$  entnommen. Die weitere Messung erfolgt wie unter a) beschrieben.

Berechnung von  $R_i/R_a$ ,  $S_i$ ,  $S_a$ 

$R_i/R_a$ : Quotient aus der Konzentration des radioaktiven Zuckers innerhalb der Vesikel und der Konzentration des radioaktiven Zuckers außerhalb der Vesikel

$S_i$ : Konzentration des unmarkierten Zuckers innerhalb der Vesikel; wird ermittelt, indem man zum Zeitpunkt des Gegentransportmaximums  $t_{max}$  den korrelierenden Wert der Effluxkurve bestimmt

$S_a$ : Konzentration des unmarkierten Zuckers außerhalb der Vesikel

Die Radioaktivität der Plasmamembranvesikel auf den Nitrozellulosefiltern wird durch den Szintillationszähler (Beckmann LS6000) in dpm ermittelt.

Die Menge des  $^{14}C$  markierten Zuckers  $R_i$  in den Vesikeln ist bei konstantem Probenvolumen und Vesikelkonzentration proportional zu den dpms.

Um die Affinität des Hexosetransportsystems zu berechnen, werden die dpm-Werte (gemessene Radioaktivität) nach Abzug der Filterleerwerte durch den Äquilibrierungswert der jeweiligen Messreihe geteilt und so in relative  $R_i/R_a$ -Werte umgerechnet. Die  $R_i/R_a$ -Werte der Gegentransportmessungen geben die Menge der in den Vesikeln akkumulierten Hexose (Gluk/Gal) an.

Der maximale  $R_i/R_a$ -Wert und der aus den Efflux-Experimenten errechnete  $S_i$ -Wert gehen in die Berechnung des  $K_m$ -Wertes mit ein.

### 2.5.3.3 Berechnung von $K_m$ nach der Wilbrandt'schen Formel

$V_{max}$  und  $K_m$  sind Parameter die das kinetische Verhalten eines Enzyms charakterisieren.  $V_{max}$  gibt an, wie hoch der Maximalumsatz des Enzyms ist.  $K_m$  gibt einen Hinweis auf die Affinität des Substrats zum Transporter (Konzentration des Substrats, bei der die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit  $\frac{V_{max}}{2}$  erreicht wird). Die Halbsättigungskonstante  $K_m$  des Transportvorgangs lässt sich nach der Formel von Wilbrandt berechnen [Wilbrandt61].

Grundsätzlich gilt, dass der Nettotransport an einer Zellmembran aus der Differenz von Influx und Efflux besteht:

$$\boxed{\text{Nettoflux} = \text{Influx} - \text{Efflux}}$$

Die Transportgeschwindigkeit  $v_r$  der radioaktiv markierten Glucose wird nach Formel ( 2-5 ) aus der Differenz der Transportgeschwindigkeiten in die Vesikel (Influx) und aus den Vesikeln (Efflux) bestimmt.

$$v_r = \frac{dr}{dt} = V_{\max} \times \left[ \frac{R_i}{R_i + S_i + K_m} - \frac{R_a}{R_a + S_a + K_m} \right] \quad ( 2-5 )$$

$r$  entspricht der Menge des radioaktiven Zuckers,  $t$  ist die Zeit. Am Maximum des Gegentransportes [ $t_{\max}$ ] sind Influx und Efflux gleich groß und die Transportgeschwindigkeit von markierter Glucose gegen Null:

$$0 = v_r = V_{\max} \times \left[ \frac{R_i}{R_i + S_i + K_m} - \frac{R_a}{R_a + S_a + K_m} \right] \quad ( 2-6 )$$

Da an diesem Punkt kein Nettotransport stattfindet, kann jetzt  $K_m$  berechnet werden. Nach Umformung der Formel ( 2-) ergibt sich:

$$\frac{R_i}{R_i + S_i + K_m} = \frac{R_a}{R_a + S_a + K_m} \quad ( 2-7 )$$

Aufgelöst nach  $R_i / R_a$  ergibt sich:

$$\frac{R_i}{R_a} = \frac{S_i + R_i + K_m}{S_a + R_a + K_m} = \frac{S_i + K_m}{S_a + K_m} \quad ( 2-8 )$$

Durch Umformung wird aus Formel ( 2-8 ) die Formel nach Wilbrandt gebildet. Mit ihr kann die Gleichgewichtskonstante  $K_m$  des Transportssystems errechnet werden:

$$K_m = \frac{S_i - \frac{R_i}{R_a} \times S_a}{\frac{R_i}{R_a} - 1} \quad ( 2-9 )$$

Nun kann die Gleichgewichtskonstante  $K_m$  des Transportsystems berechnet werden, wobei der maximale  $R_i/R_a$ -Wert aus den Gegentransport-Versuchen und der dazugehörige  $S_i$ -Wert zum Zeitpunkt  $t_{max}$  aus den Efflux- Versuchen stammt.

$K_m$  = Halbsättigungskonstante des Hexosetransportes

$V_{max}$  = Maximale Geschwindigkeit des Transporters

$t$  = Zeit in Minuten

$S_i$  = Konzentration des Zuckers in den Vesikeln (hier: 50 mM)

$S_a$  = Konzentration des Zuckers außen

(hier: für die Hexose(Gluk/Gal)- Außenkonzentration  $S_a$  zum Zeitpunkt  $t_{max}$  wird näherungsweise der  $S_a$ -Wert nach Konzentrationsausgleich am Ende des Versuchs eingesetzt. Daraus ergibt sich folgender Wert:

$30 \mu\text{l Vesikelvolumen} * 50 \text{ mM Hexose} / 1100 \mu\text{l Gesamtvolumen} = 1,4 \text{ mM Hexose}$ )

$R_i$  = Konzentration des entsprechenden radioaktiven Zuckers innen

$R_a$  = Konzentration des entsprechenden radioaktiven Zuckers außen

(hier:  $1,7 \mu\text{M}$  nach Äquilibrierung innen und außen zum Zeitpunkt  $t=0$ )

$r$  = Menge der radioaktiven Hexose

$s$  = Menge der Hexose

$V_{max}$  kann nicht berechnet, sondern nur aus der Graphik abgelesen werden. Es kann aber ein Computersimulationsprogramm angewendet werden wie G.F. Fuhrmann und B. Völker zeigen [Fuhrmann89(1)].

## 2.6 Verwendete Materialien und Geräte

Agar-Agar, hochfein	E.Merck AG, Darmstadt
D-(+)-Galaktose	E.Merck AG, Darmstadt
D-(U- <sup>14</sup> C)-Galaktose	
D-(+)-Glukose-Monohydrat	E.Merck AG, Darmstadt
D-(U- <sup>14</sup> C)-Glukose	Amersham Buchler, Braunschweig
EDTA p.a.	E.Merck AG, Darmstadt
Glasfaserfilter ,GF 92 Ø 22 mm	Schleicher & Schüll, Dassel
Glasfaserfilter 200 S, SM 13400	Sartorius, Göttingen
Glycin p.a.	C.Roth KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	E.Merck AG, Darmstadt
Kapillarröhrchen, nicht heparinisiert	SUPE-O-RIOR
KCL p.a.	E.Merck AG, Darmstadt
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge	Sorvall, Dupont Instr.,Newtown, CT USA
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Puffer, pH 6,5	E.Merck AG, Darmstadt
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	E.Merck AG, Darmstadt
PMSF, reinst	Serva GmbH & Co, Heidelberg
Polypropylenglykol P2000 p.a.	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Software-GraphPad Prism 2.01	H.J.Motulsky, San Diego, USA ( <a href="http://www.graphpad.com">http://www.graphpad.com</a> )
Szintillationsflüssigkeit Rotiszint 11	C.Roth KG, Karlsruhe
Szintillationsröhrchen	Zinsser, Frankfurt/Main
Szintillationsspektrometer LS 60000 IC	Beckmann Instruments, Fullerton California, USA
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus Christ
Uracil p.a.	E.Merck AG, Darmstadt
Zellhomogenisator	B.Braun, Melsungen
Zellulosenitratfilter, 0,65 µm	Sartorius Göttingen

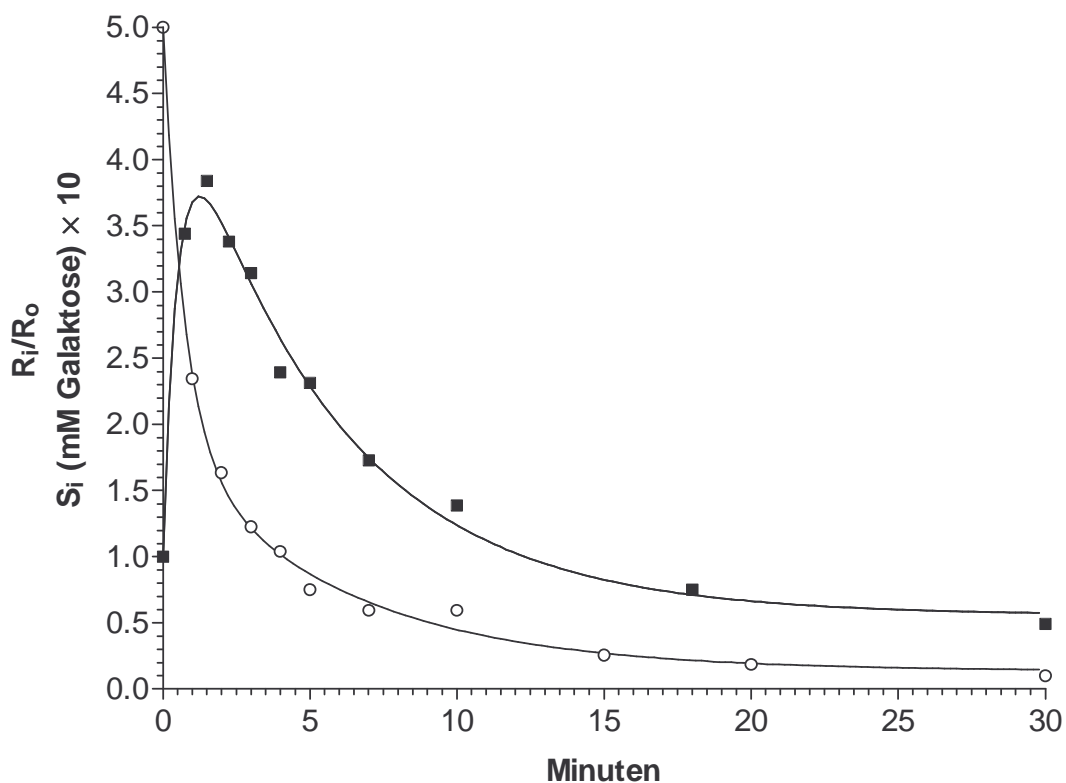


### 3 Ergebnisse

Alle hier dargestellten Versuche wurden nach den in Abschnitt 2 beschriebenen Methoden durchgeführt.

#### 3.1 Versuche mit Plasmamembranvesikeln aus der Nullmutante RE700 mit und ohne Galaktose-Induktion

##### 3.1.1 Galaktose-Gegentransport und Galaktose-Efflux an Plasmamembranvesikel, präpariert aus der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion



**Abbildung 3.1.1:**

Graphische Darstellung von Galaktose-Gegentransport und Galaktose-Efflux an der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion.  $R_i/R_o$  Verhältnis der Konzentration radioaktiver Galaktose innerhalb und außerhalb der Vesikel.  $S_i$  Galaktosekonzentration  $\times 10$  in den Vesikeln.

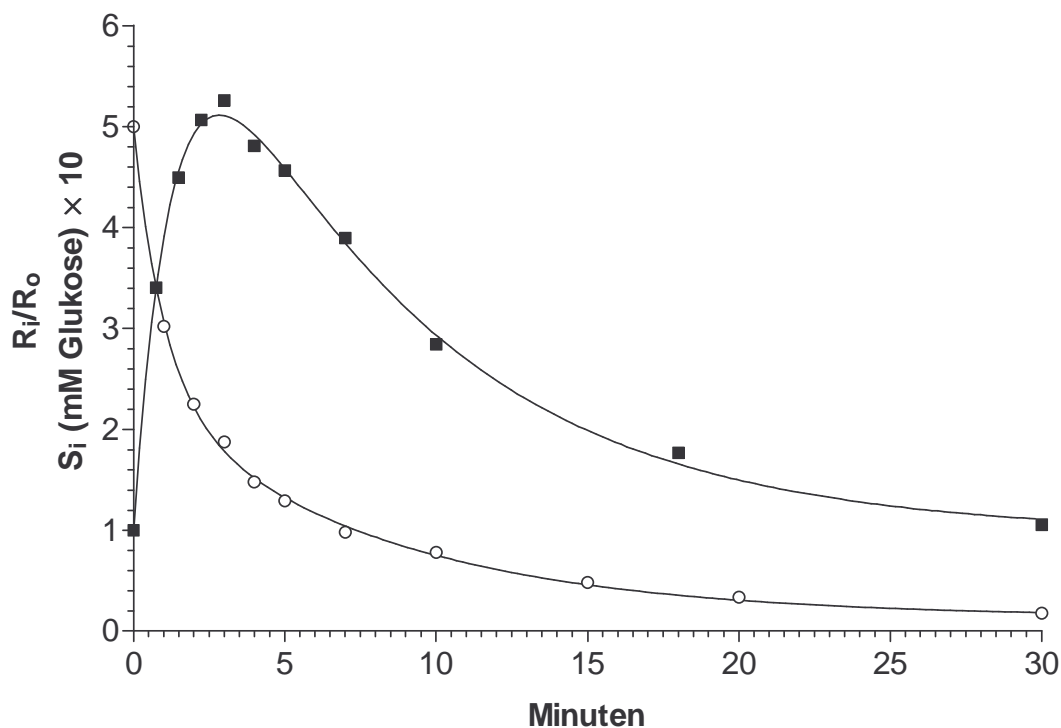
In der folgenden Tabelle sind die  $K_m$ -Werte von drei Einzelmessungen und der entsprechende Mittelwert aufgeführt.

<b><math>K_m</math>-Werte der Einzelversuche</b>	6,36 mM	6,53 mM	5,25 mM
<b>Mittelwert</b>	6,05 mM		

**Tabelle 3.1.1:** Einzelwerte und Mittelwert der aus dem Gegentransport berechneten  $K_m$ -Werte für Galaktose an der Galaktose-induzierten Nullmutante RE700

Die Gegentransportversuche mit Galaktose (D-<sup>14</sup>C-Galaktose – D-Galaktose) an Plasmamembranvesikeln präpariert aus der mit Galaktose induzierten Nullmutante zeigen eindeutig, dass Galaktose vom Gal2-Transporter nach dem Typ des „facilitated diffusion“ Mechanismus transportiert wird. Es handelt sich dabei um einen gekoppelten Substrattransport. Nach dem  $K_m$ -Wert von 6,05 mM ist der Galaktosetransporter dem Hxt4 Glukosetransporter sehr ähnlich, der im Vergleich einen  $K_m$ -Wert von  $6,2 \pm 0,6$  mM aufweist [Maier01].

### 3.1.2 Glukose-Gegentransport und Glukose-Efflux an Plasmamembranvesikeln, präpariert aus der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion



**Abbildung 3.1.2:** Graphische Darstellung von Glukose-Gegentransport und Glukose-Efflux am Nulltyp RE 700 nach Galaktose-Induktion.  $R_i/R_o$  Verhältnis der Konzentration radioaktiver Glukose innerhalb und außerhalb der Vesikel.  $S_i$  Glukosekonzentration  $\times 10$  in den Vesikeln.

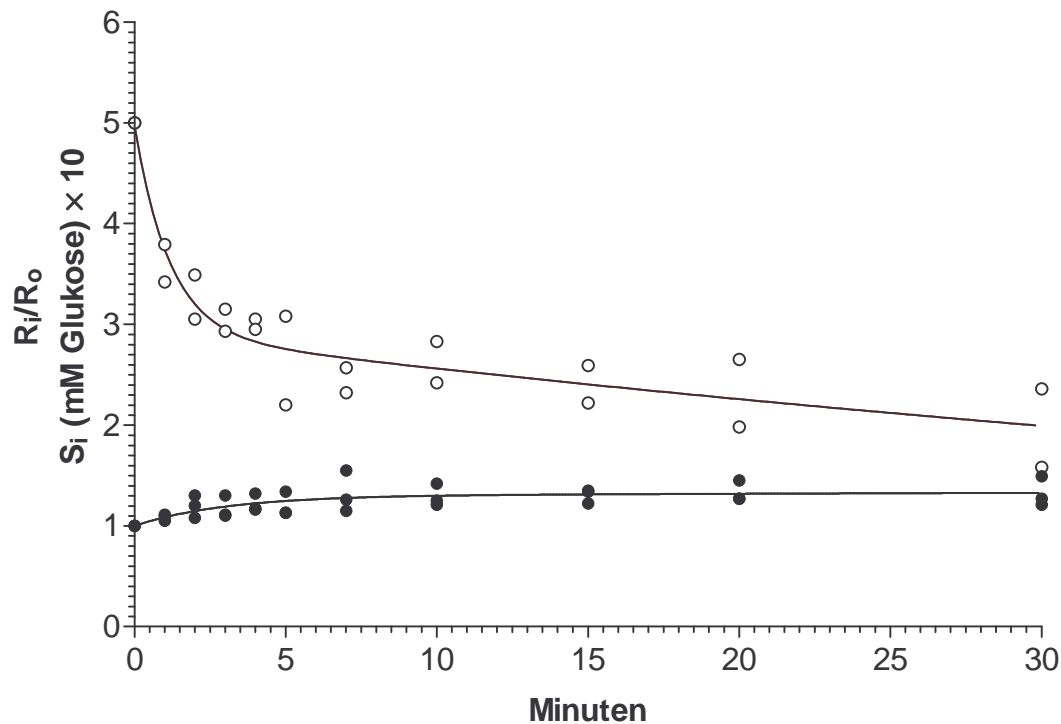
Die Tabelle zeigt die  $K_m$ -Werte von 6 Einzelmessungen sowie den Mittelwert  $\pm$  SD.

<b><math>K_m</math>-Werte der Einzelversuche in mM</b>	3,94	1,96	3,97	2,01	2,19	2,35
<b><math>K_m</math>-Mittelwert <math>\pm</math> SD in mM (n= 6)</b>	2,74 $\pm$ 0,95					

**Tabelle 3.1.2:** Einzelwerte und Mittelwert  $\pm$  SD der aus dem Gegentransport berechneten  $K_m$ -Werte für Glukose an der Galaktose-induzierten Nullmutante RE700

Die Gegentransportversuche mit Glukose an Plasmamembranvesikeln aus der galaktose-induzierten Nullmutante zeigen, dass auch Glukose vom Gal2-Transporter nach dem Typ der „facilitated diffusion“ transportiert wird. Der hier berechnete  $K_m$ -Wert von  $2,74 \pm 0,95$  mM lässt vermuten, dass Glukose eine größere Affinität zum Gal2 Transporter besitzt als sein natürliches Substrat Galaktose. Diese Tatsache lässt sich auch aus dem Gegentransportmaximum der Abbildungen 3.4.2 und 3.4.1 entnehmen. Das Galaktose-Gegentransportmaximum  $R_i/R_o$  liegt unter 4 im Gegensatz zu dem höheren Gegentransportmaximum bei Glukose von über 5.

### 3.1.3 Glukose-Gegentransport und Glukose-Efflux an Plasmamembranvesikeln aus der Nullmutante RE700 ohne Galaktose-Induktion

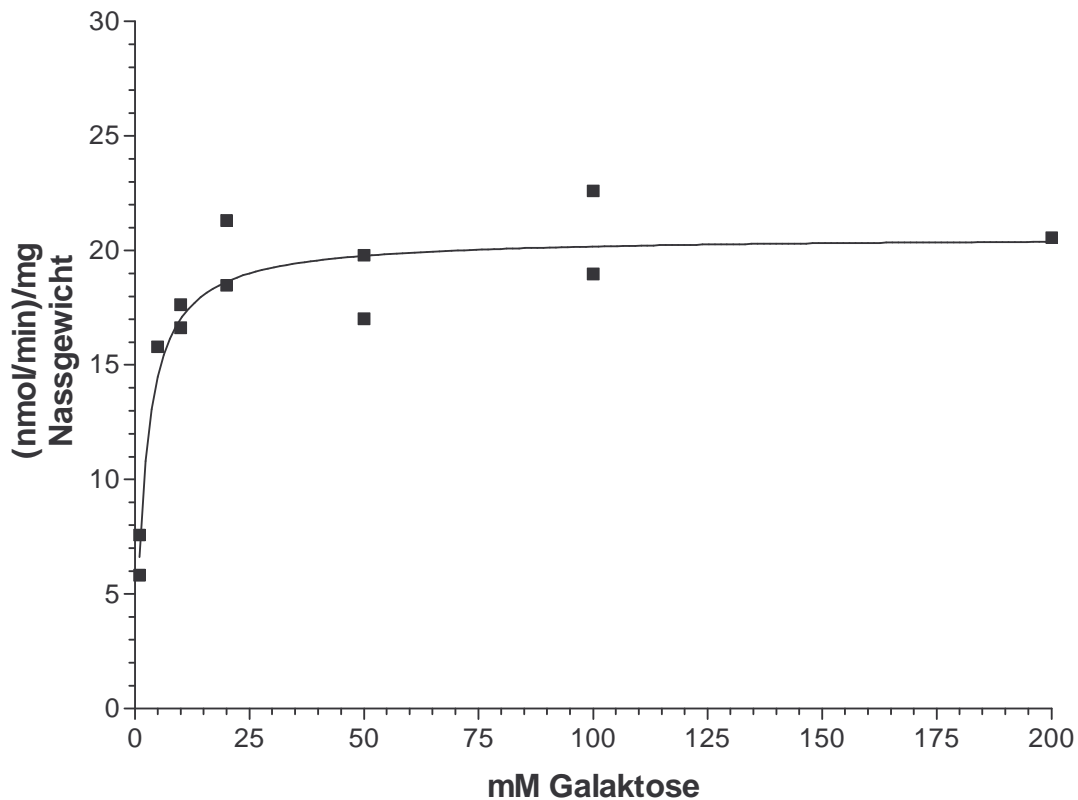


**Abbildung 3.1.3:** Graphische Darstellung von Glukose-Gegentransport und Glukose-Efflux an Plasmamembranvesikeln des Nulltyp RE700 ohne Galaktose-Induktion.  $R_i/R_o$  Verhältnis der Konzentration radioaktiver Glukose innerhalb und außerhalb der Vesikel.  $S_i$  Glukosekonzentration  $\times 10$  in den Vesikeln.

Das Ergebnis an Plasmamembranvesikeln der Nullmutante ohne Galaktose-Induktion zeigt, dass kein signifikanter Gegentransport von Glukose stattfindet. Der vorhandene Glukoseefflux ist wahrscheinlich auf sogenannte „leaky vesicles“ zurückzuführen, der jedoch keinen Gegentransport von Glukose treiben kann. Ein weiterer Versuch zeigt ein ähnliches Ergebnis (nicht dargestellt).

## 3.2 Versuche an intakten Zellen der Nullmutante RE700 mit und ohne Galaktose-Induktion

### 3.2.1 Initiale Galaktoseaufnahme in Zellen der Nullmutante RE700, die auf Galaktose gewachsen sind (Induktion des Gal2 Transporters)



**Abbildung 3.2.1:** Graphische Darstellung der Aufnahmegeschwindigkeit von Galaktose in (nmol/min)/mg Nassgewicht in Zellen der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion gegen die Galaktosekonzentration. Initiale Aufnahme (5 s) bei 25° C. Spätexponentielle Wachstumsphase, Medium 2% Galaktose .

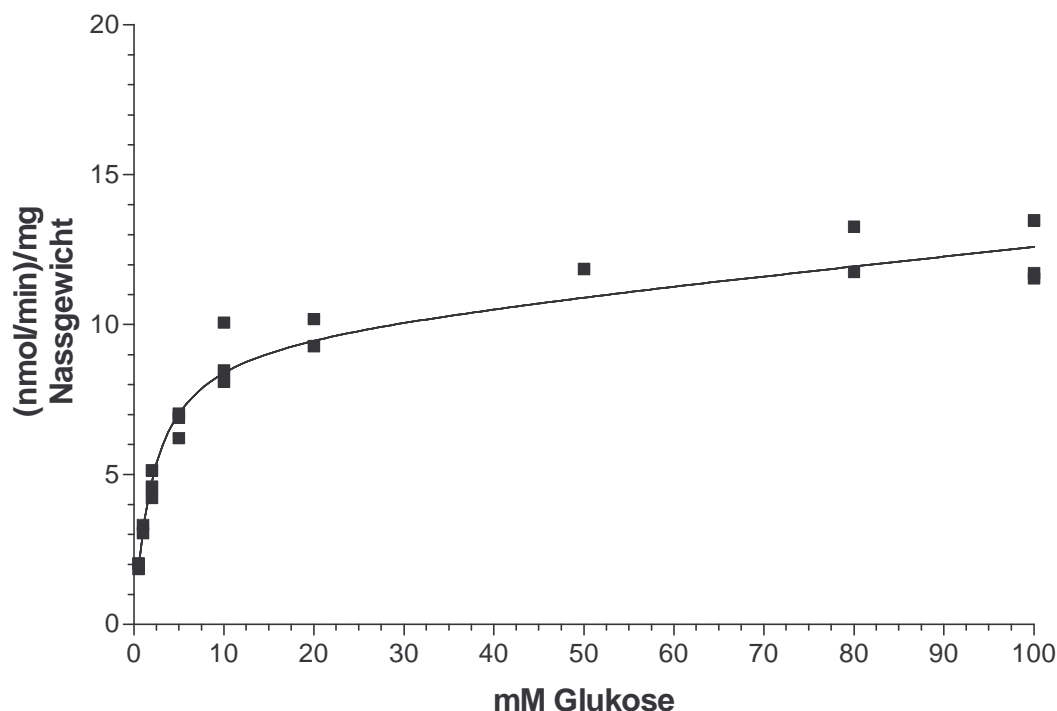
Die Abbildung zeigt, dass Galaktose in Abhängigkeit von der Konzentration in die Zellen der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion aufgenommen wird. Die genaue Kinetik wurde mit dem Computerprogramm GraphPad Prism mit Hilfe von nichtlinearer Regression auf zwei Modelleigenschaften hin untersucht. Das erste Modell bestand aus einem Michaelis-Menten Term und das zweite Modell aus einem Michaelis-Menten Term und einem Term erster Ordnung (z.B. Diffusion). Die nachfolgende Tabelle gibt das Ergebnis wieder.

Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min)/mg
3.3.2	20,28	2,30	
3.3.2	21,04	1,80	
<b>2 Experimente</b>	<b>20,66</b>	<b>2,05</b>	

**Tabelle 3.2.1:** Die Tabelle zeigt die kinetischen Parameter  $V_{\max}$  in (nmol/min)/mg Nassgewicht) und  $K_m$  in mM aus den zwei initialen Aufnahmeversuchen mit Galaktose als Substrat an Zellen der Nullmutante RE700 nach Gaktose-Induktion. Die Messreihen wurden jeweils mit einem Michaelis-Menten Term und einem Michaelis-Menten Term mit einem gekoppelten Term erster Ordnung analysiert. Ein Vergleich mittels f-Test fiel zugunsten des Modells mit einem Michaelis-Menten Terms aus.

Im Gegensatz zu den Resultaten des Gegentransports zeigt der Galaktosetransporter Gal2 mit Galaktose als Substrat bei den zwei Aufnahmeversuchen eine etwas höhere Affinität mit einem mittleren  $K_m$ -Wert von 2,05 im Vergleich zu 6,05 mM beim Gegentransport. Ein Term erster Ordnung (Diffusion) war nicht nachweisbar. Eine statistische Analyse der  $K_m$ -Werte erfolgt nach Auswertung aller Aufnahmeversuche.

### 3.2.2 Initiale Glukoseaufnahme in Zellen der Nullmutante auf Galaktose gewachsen (Induktion des Gal2-Transporters)



**Abbildung 3.2.2:** Graphische Darstellung der Aufnahme­geschwindigkeit von Glukose in Zellen der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion gegen die Glukosekonzentration. Initiale Aufnahme (5 sec.) bei 25° C. Spätexponentielle Wachstumsphase, Medium 2% Galaktose.

Die kinetische Auswertung des obigen Versuchs ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

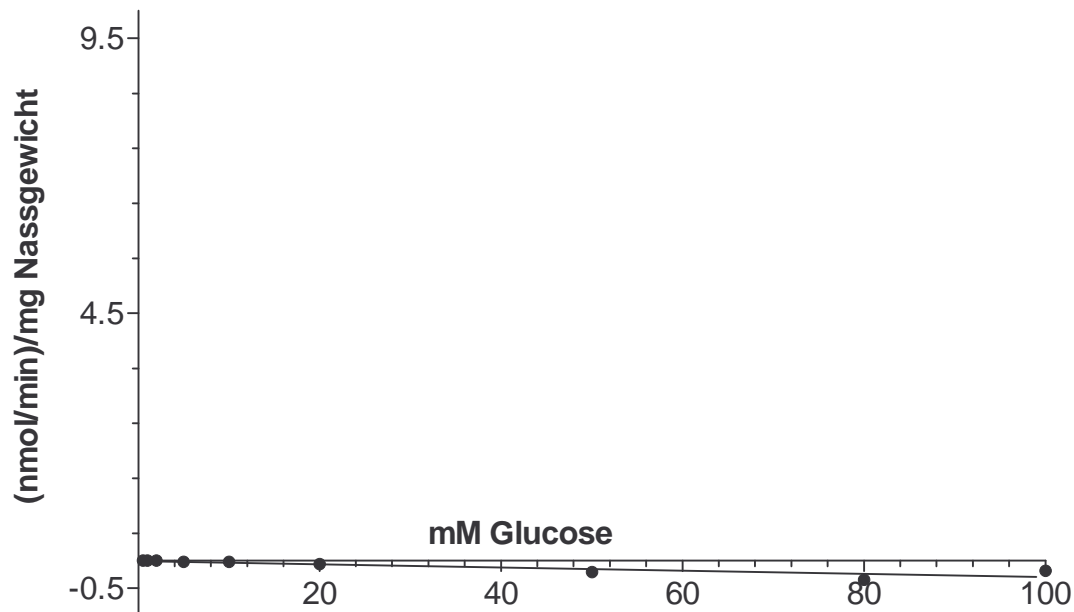
Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min)/mg
3.3.1	12,60	2,84	
3.3.1	10,00	2,21	0,0223
3.3.1	11,43	2,91	
<b>3 Experimente</b>	<b>11,34</b>	<b>2,65</b>	

**Tabelle 3.2.2:** Die Tabelle zeigt die kinetischen Parameter  $V_{\max}$  in (nmol/min)/mg Nassgewicht),  $K_m$  in mM und  $K_d$  in ( $\mu$ l/min)/mg Nassgewicht aus den drei initialen Aufnahmeversuchen mit Glukose als Substrat an Zellen der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion. Die Messreihen wurden jeweils mit einem Michaelis-Menten Term und einem Michaelis-Menten Term mit einem gekoppelten Term erster Ordnung analysiert. Ein Vergleich mittels f-Test fiel in zwei Experimenten zugunsten des Modells mit einem Michaelis-Menten Term aus und ein Experiment konnte signifikant besser mit einem Michaelis-Menten Term und einem Term erster Ordnung analysiert werden.

Die drei initialen Aufnahmeversuche mit Glukose an der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion zeigten in einem Experiment, dass die kinetische Analyse mit einem Michaelis-Menten Term und einem Term erster Ordnung statistisch bevorzugt war.



### 3.2.3 Initiale Glukoseaufnahme in Zellen der Nullmutante RE700 ohne Galaktose-Induktion



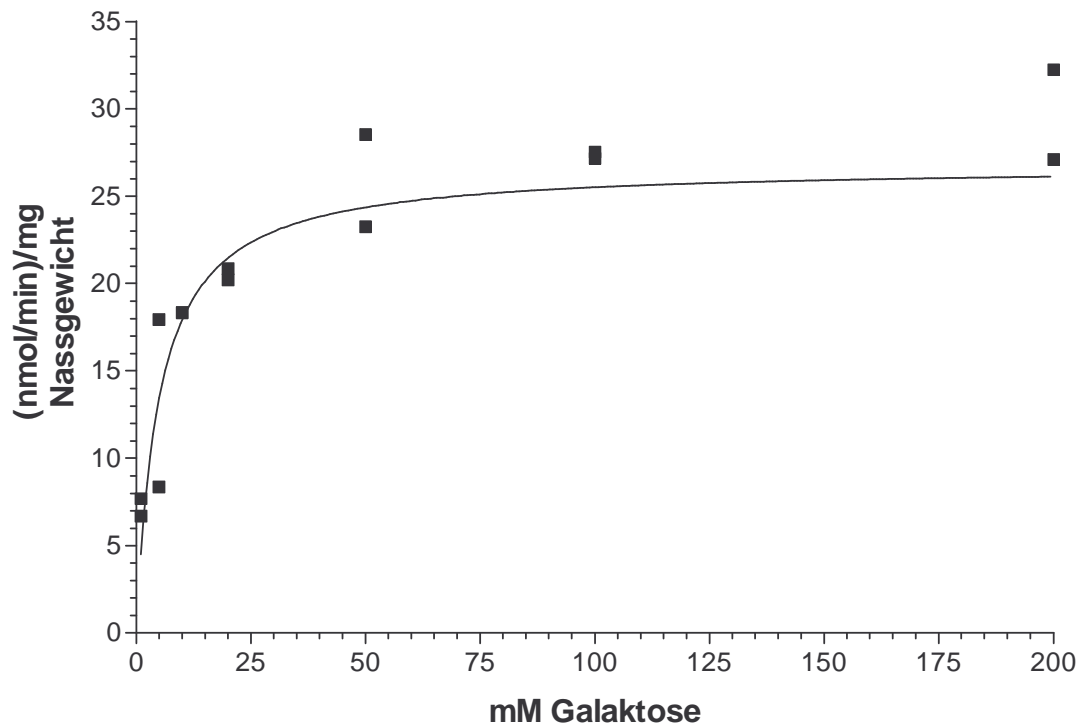
**Abbildung 3.2.3:** Graphische Darstellung der Aufnahmegeschwindigkeit von Glukose in (mmol/min)/mg Nassgewicht gegen die Glukosekonzentration. Initialen 5-Sekundenaufnahme in Zellen des Nulltyps RE 700; ohne Galaktose-Induktion; spätexponentiell. Ein weiterer gleichartiger Versuch ist nicht dargestellt.

Wie aus der Abbildung 3.2.3 hervorgeht, lässt sich ohne eine Galaktose-Induktion bei der Nullmutante RE700 keine Glukoseaufnahme nachweisen. Dasselbe ist auch für die Galaktoseaufnahme anzunehmen.

Die initialen Aufnahmeversuche an der Nullmutante RE700 zeigen wie bei den Gegentransportversuchen an den entsprechenden Plasmamembranvesikeln, dass nach Galaktose-Induktion sowohl Galaktose als auch Glukose in die Zelle aufgenommen wird.

### 3.3 Versuche an intakten Zellen des Wildtyps 996A mit Galaktose-Induktion

#### 3.3.1 Initiale Galaktoseaufnahme in Zellen des Wildtyps 996A auf Galaktose gewachsen (Induktion des Gal2-Transporters)



**Abbildung 3.3.1:** Graphische Darstellung der Aufnahmegeschwindigkeit von Galaktose in (nmol/min)/mg Nassgewicht gegen die Galaktosekonzentration. Initialen 5-Sekundenaufnahme von Galaktose in Zellen des Wildtyps 996A, die auf 2% Galaktose gewachsen waren. Wachstumsphase spätexponentiell.

Die kinetische Auswertung der obigen 2 Versuche ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min/mg)
3.1.2	28,73	7,84	
3.1.2	21,26	1,80	0,0579
<b>2 Experimente</b>	<b>25,00</b>	<b>4,82</b>	

**Tabelle 3.3.1:** Die Tabelle 3.1.2 zeigt die kinetischen Parameter aus initialen Aufnahmeversuchen mit Galaktose als Substrat an Zellen des Wildtyps 996A nach Gaktose-Induktion. Die Messreihen wurden jeweils mit einem Michaelis-Menten Term und einem Michaelis-Menten Term mit einem gekoppelten Term erster Ordnung analysiert. Im Vergleich mittels f-Test war ein Versuch mit einem Michaelis-Menten Term statistisch besser als die Kombination.

Die initialen Aufnahmeversuche mit Galaktose an den Zellen des Wildtyps 996A nach Galaktose-Induktion zeigen im Mittel zwar einen etwas höheren  $K_m$ -Wert als die entsprechenden Versuche an den Zellen der Nullmutante. Eine statistische Bewertung findet nach Auswertung aller Einzelversuche im letzten Kapitel der Ergebnisse statt.

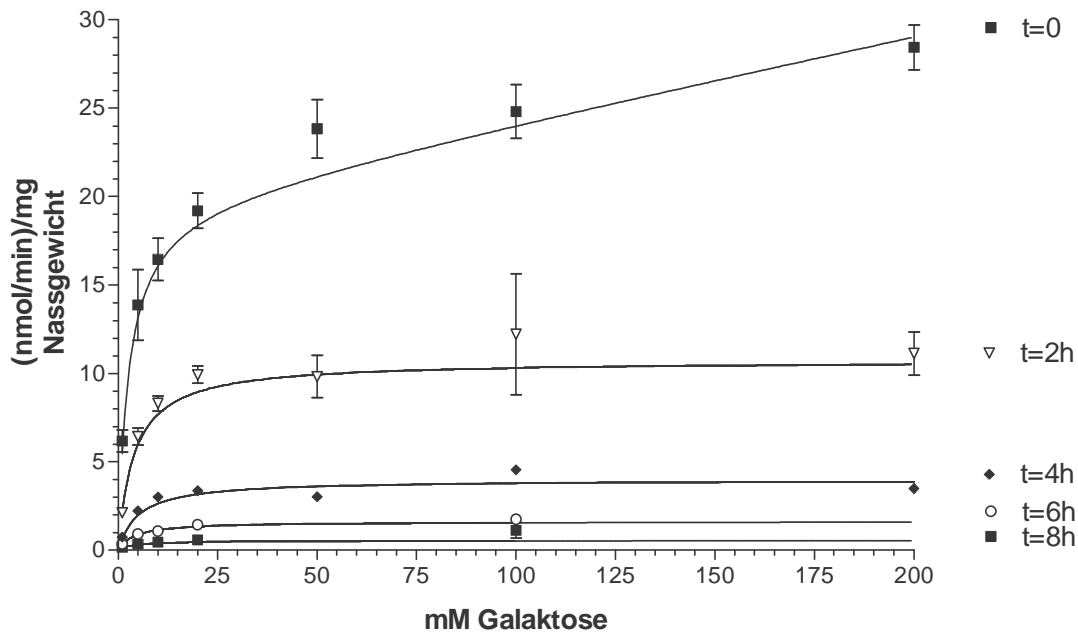
### 3.4 „Shiftversuche“ von Galaktose nach Glukose am Wildtyp MC996A und an der Nullmutante RE700

Als einen „Shiftversuch“ bezeichnet man das Umsetzen der Hefezellen von einem Zuckermedium auf einen anderen Zucker. Beim Shift vom 2%-tigen Glukosemedium auf ein Galaktosemedium findet in den Wildtypzellen ein Abbau der Glukosetransporter und eine Induktion des Gal2 Transportsystem statt. Da es für Galaktose im Zellinneren im nicht induzierten Zustand keine katabolen Stoffwechselwege gibt, müssen außerdem die Enzyme Galaktokinase (Gal1), Galaktose-1-phosphat-Uridyl-Transferase (Gal7) und UDP-Galaktose-4-Epimerase (Gal10) induziert werden. Die Summe der Reaktionen, die von Galaktosepermease, Galaktokinase, Transferase und Epimerase (Leloir-Enzyme) katalysiert werden führen von Galaktose in der Zelle zu Glukose-1-phosphat.

Die Expression der 4 Gene GAL1, GAL2, GAL4 und GAL10 erfolgt koordiniert. Die Anwesenheit von Galaktose bewirkt die oben beschriebene Induktion während ein „Shift“ auf Glukose den gegenteiligen Effekt, eine Repression der Enzyme hervorruft. Bei der Repression werden die Leloir-Enzyme irreversibel katabolit-inaktiviert. Durch Glukose induziert wird der Transporter Gal2 in der Vakuole abgebaut.

Durch einen „Shift“ der Zellen nach Glukose, die ursprünglich auf Galaktose gewachsen sind, ist es möglich die Geschwindigkeit des Abbaus des Galaktosetransporters Gal2 kinetisch zu messen. Durch Bestimmung der  $V_{max}$ , der maximale Transportgeschwindigkeit, die proportional der Anzahl der Transporter in der Plasmamembran ist, kann der Abbau des Galaktosetransporters verfolgt werden.

### 3.4.1 Initiale Galaktoseaufnahme nach „Glukoseshift“ der Zellen des Wildtyps 996A



**Abbildung 3.4.1:**

Graphische Darstellung der initialen Galaktoseaufnahme in die Zellen des Wildtyps MC996A, die auf 2% Galaktose gewachsen und auf 5% Glukose geschiftet worden sind. Aufnahmemessung zu verschiedenen Zeitpunkten t nach der Shift. Die Anzucht geschah unter aeroben Bedingungen. Die Anzahl der Experimente und die Analyse der kinetische Parameter ist in der nachfolgenden Tabelle 3.5.1 dargestellt.

Die Graphik zeigt, dass sich die Galaktoseaufnahme im Laufe der Zeit t nach der „Shift“ kontinuierlich vermindert, bis nach acht Stunden fast keine Galaktoseaufnahme mehr nachweisbar ist.

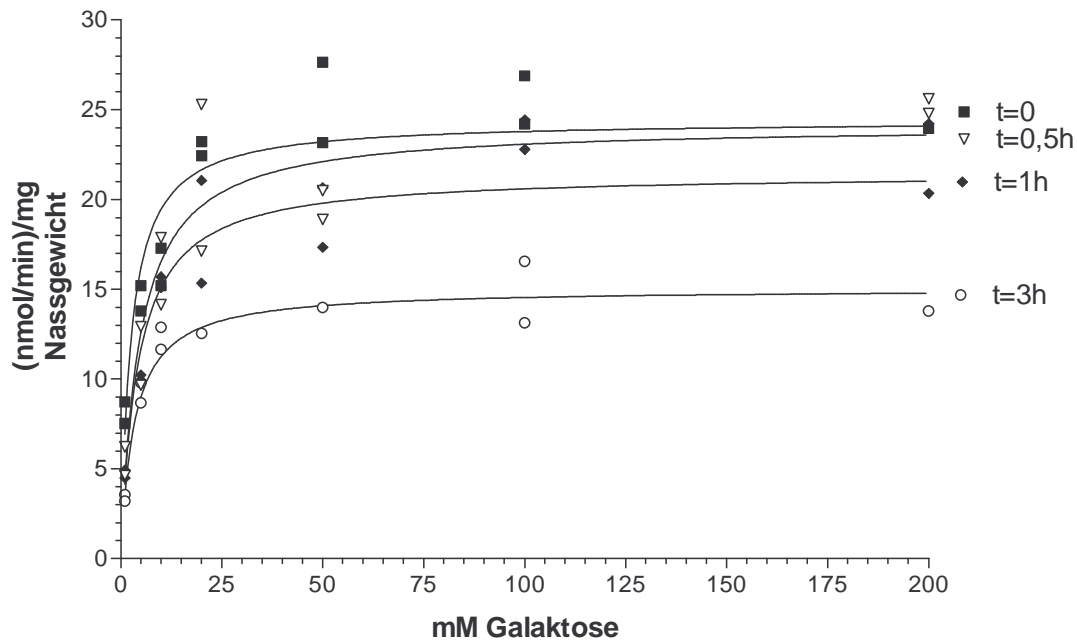
Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min)/mg
3.5.1	21,95	3,40	0,0270
3.5.1	21,28	3,12	
3.1.2	28,73	7,84	
3.1.2	21,26	1,80	0,0574
<b>4 Exp. T = 0</b>	<b>23,31 <math>\pm</math> 3,63 SD</b>	<b>4,04 <math>\pm</math> 2,63 SD</b>	
3.5.1	8,69	2,47	
3.5.1	9,78	3,95	
3.1.2	14,31	6,82	
3.1.2	13,17	4,80	
<b>4 Exp. T = 2h</b>	<b>11,49 <math>\pm</math> 2,68 SD</b>	<b>4,51 <math>\pm</math> 1,82 SD</b>	
3.5.1	3,96	4,61	
3.5.1	3,56	2,81	
3.1.2	4,61	8,17	
3.1.2	3,52	3,08	
<b>4 Exp. T = 4h</b>	<b>3,91 <math>\pm</math> 0,51 SD</b>	<b>4,67 <math>\pm</math> 2,47 SD</b>	
3.5.1	1,35	2,66	
3.5.1	1,70	2,88	
3.1.2	1,59	5,75	0,0087
3.1.2	1,52	3,92	
<b>4 Exp. T = 6h</b>	<b>1,54 <math>\pm</math> 0,15 SD</b>	<b>3,30 <math>\pm</math> 0,63 SD</b>	
3.5.1	0,30	1,94	
3.5.1	0,59	2,60	
3.1.2	0,63	2,37	
3.1.2	1,00	7,12	
<b>4 Exp. T = 8h</b>	<b>0,63 <math>\pm</math> 0,29 SD</b>	<b>3,51 <math>\pm</math> 2,42 SD</b>	

**Tabelle 3.4.1:** Kinetische Auswertung der in Abb.3.4.1 dargestellten experimentellen Messwerte zum Zeitpunkt t. Ein Term erster Ordnung (Diffusion,  $K_d$ ) ließ sich nur in 3 von 20 Experimenten als statistisch wahrscheinlich erweisen. Kinetische Parameter  $V_{\max}$  und  $K_m$  Mittelwerte der Einzelversuche  $\pm$  SD sowie  $K_d$ .

Aus der zeitlichen Abnahme der  $V_{\max}$  des Galaktosetransportes nach der „Glukoseshift“ kann auf einen vollständigen und schnellen Abbau des Galaktosetransporters Gal2 im Wildtyp 996A geschlossen werden. Bereits nach 2 Stunden sind danach mehr als 50% der Galaktosetransporter nicht mehr vorhanden und nach 8 Stunden sind es über 97%. Dagegen behalten die  $K_m$ -Werte über die ganze Zeit eine niedrige Affinität mit einem mittleren  $K_m$ -Wert aus den 20 Einzelexperimenten von  $4,09 \text{ mM} \pm 0,44 \text{ SE}$ . Da in diesen Versuchen die Aufnahme von Galaktose untersucht wird, kann das Ergebnis nicht durch die Induktion von Glukosetransportern beeinflusst werden.

### 3.4.2 Initiale Galaktoseaufnahme nach „Glukoseshift“ an den Zellen des Nullmutante RE700

Versuchsdauer bis drei Stunden



**Abbildung 3.4.2:**

Graphische Darstellung der initialen 5-Sekunden-Aufnahme von Galaktose in Zellen der Nullmutante RE700, die vorher auf 2% Galaktose gewachsen sind. Die Galaktoseaufnahme wurde zu verschiedenen Zeitpunkten  $t$  nach der Shift auf 5% Glukose bestimmt. Die Anzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen. Die Anzahl der Experimente und die kinetischen Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle 3.4.2 dargestellt.

Aus der Abbildung 3.4.2 gewinnt man den Eindruck, dass die Galaktose-Aufnahme der Nullmutante RE700 im Vergleich zu den entsprechenden Versuchen des Wildtyps 996A langsamer abzunehmen scheint.

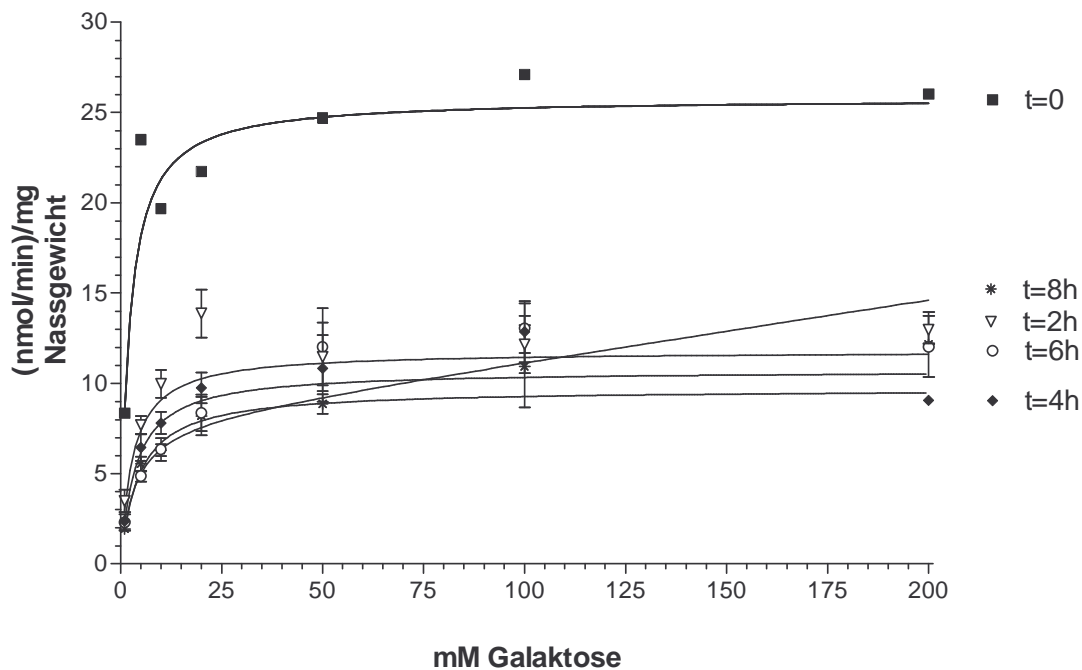
Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min/mg)
3.6.1.1	25,35	3,20	
3.6.1.1	23,75	2,00	
<b>2 Exp. T = 0</b>	<b>24,55</b>	<b>2,60</b>	
3.6.1.1	25,53	5,60	
3.6.1.1	22,22	3,15	
<b>2 Exp. T = 0,5h</b>	<b>23,88</b>	<b>4,38</b>	
3.6.1.1	21,02	4,21	
3.6.1.1	21,91	4,17	
<b>2 Exp. T = 1h</b>	<b>21,47</b>	<b>4,19</b>	
3.6.1.1	14,45	2,86	
3.6.1.1	15,79	3,98	
<b>2 Exp. T = 3h</b>	<b>15,12</b>	<b>3,42</b>	

**Tabelle 3.4.2:** Kinetische Auswertung der in Abbildung 3.4.2 dargestellten Galaktoseaufnahme an der Nullmutante RE700. Statistisch war in allen Versuchen nur ein Michaelis-Menten Term wahrscheinlich.  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte  $\pm$  SD.

Die maximale Transportgeschwindigkeit  $V_{\max}$  in der Nullmutante RE700 hat bis zu einer Stunde nur um 12% abgenommen und nach 3 Stunden um 38%. Die  $K_m$ -Werte sind in etwa gleichgeblieben mit mittleren  $K_m$ -Werten zwischen 2,6 und 4,38 mM.



### 3.4.3 Versuchsdauer bis acht Stunden



**Abbildung 3.4.3:**

Graphische Darstellung der initialen 5-Sekunden-Aufnahme von Galaktose in Zellen der Nullmutante RE700, die vorher auf 2% Galaktose gewachsen sind. Die Galaktoseaufnahme wurde zu verschiedenen Zeitpunkten  $t$  nach der Shift auf 5% Glukose bestimmt. Die Anzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen. Die Anzahl der Experimente und die kinetischen Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle 3.4.3 dargestellt.

Wie bereits in der vorhergehenden Messreihe nach 3 Stunden angedeutet, so zeigt der obige Versuch, dass auch noch nach 8 Stunden in der Nullmutante RE700 eine beträchtliche Galaktoseaufnahme stattfindet.

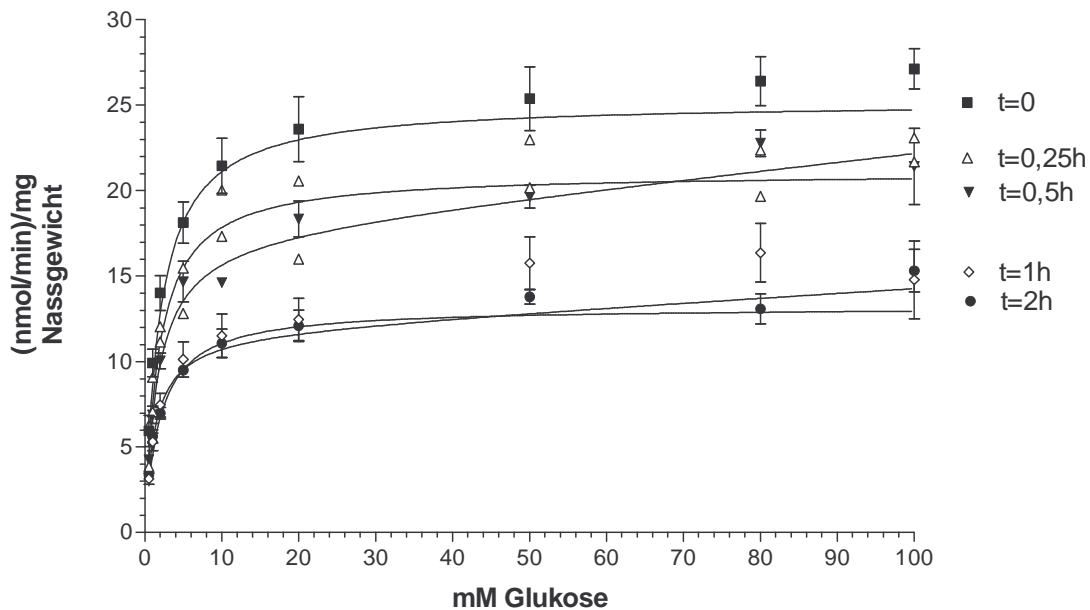
Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min/mg)
3.6.1.2	25,74	2,39	
3.6.1.2	25,58	1,66	
<b>2 Exp. T = 0</b>	<b>25,66</b>	<b>2,03</b>	
3.6.1.2	9,77	3,07	
3.6.1.2	10,86	3,01	
3.6.1.2	14,29	2,64	
3.6.1.2	14,17	2,35	
<b>4 Exp. T = 2h</b>	<b>12,27 <math>\pm</math> 2,30 SD</b>	<b>2,77 <math>\pm</math> 0,34 SD</b>	
3.6.1.2	8,66	2,73	
3.6.1.2	7,42	1,84	0,0197
3.6.1.2	13,27	5,37	
3.6.1.2	12,73	4,16	
<b>4 Exp. T = 4h</b>	<b>10,52 <math>\pm</math> 2,92 SD</b>	<b>3,53 <math>\pm</math> 1,56 SD</b>	
3.6.1.2	6,10	2,54	0,0356
3.6.1.2	9,97	4,47	
3.6.1.2	15,21	8,58	
3.6.1.2	13,35	7,49	
<b>4 Exp. T = 6h</b>	<b>11,16 <math>\pm</math> 4,01 SD</b>	<b>5,77 <math>\pm</math> 2,77 SD</b>	
3.6.1.2	9,29	3,83	
3.6.1.2	7,69	2,40	
3.6.1.2	11,54	7,61	
3.6.1.2	11,68	4,82	
<b>4 Exp. T = 8h</b>	<b>10,05 <math>\pm</math> 1,92 SD</b>	<b>4,67 <math>\pm</math> 2,20 SD</b>	

**Table 3.4.3:** Kinetische Auswertung der in Abbildung 3.4.3 dargestellten Galaktoseaufnahme an der Nullmutante RE700. In 2 von 18 Experimenten war zusätzlich zum Michaelis-Menten Term noch ein Term erster Ordnung (Diffusion,  $K_d$ ) nachweisbar.  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte  $\pm$  SD.

Die maximale Transportgeschwindigkeit  $V_{\max}$  für Galaktose in der Nullmutante RE700 hat nach 8 Stunden im Glukosemedium erst um 60% abgenommen im Gegensatz zu dem Wildtyp 996A, der bei entsprechenden Versuchen bereits eine Verminderung um 97% aufwies. Der zeitliche Verlauf der Abnahme der  $V_{\max}$  lässt darauf schließen, dass die Abnahme der  $V_{\max}$  auf ein Plateau zustrebt. Eine nähere Analyse erfolgt in der Abbildung. Wie vorhergehend sind die  $K_m$ -Werte in der Größenordnung etwa gleich geblieben.

### 3.4.4 Initiale Glukoseaufnahme nach „Glukoseshift“ an den Zellen der Nullmutante RE700

Versuchsdauer bis zwei Stunden



**Abbildung 3.4.4:**

Graphische Darstellung der initialen 5-Sekunden-Aufnahme von Glukose in Zellen der Nullmutante RE700, die auf 2% Galaktose gewachsen sind. Shift auf 5% Glukose. Nachfolgend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten  $t$  die Glukoseaufnahme bestimmt. Die Zellkultur erfolgte unter aeroben Bedingungen. Die Anzahl der Experimente und die kinetischen Parameter sind der nachfolgende Tabelle 3.4.4. zu entnehmen.

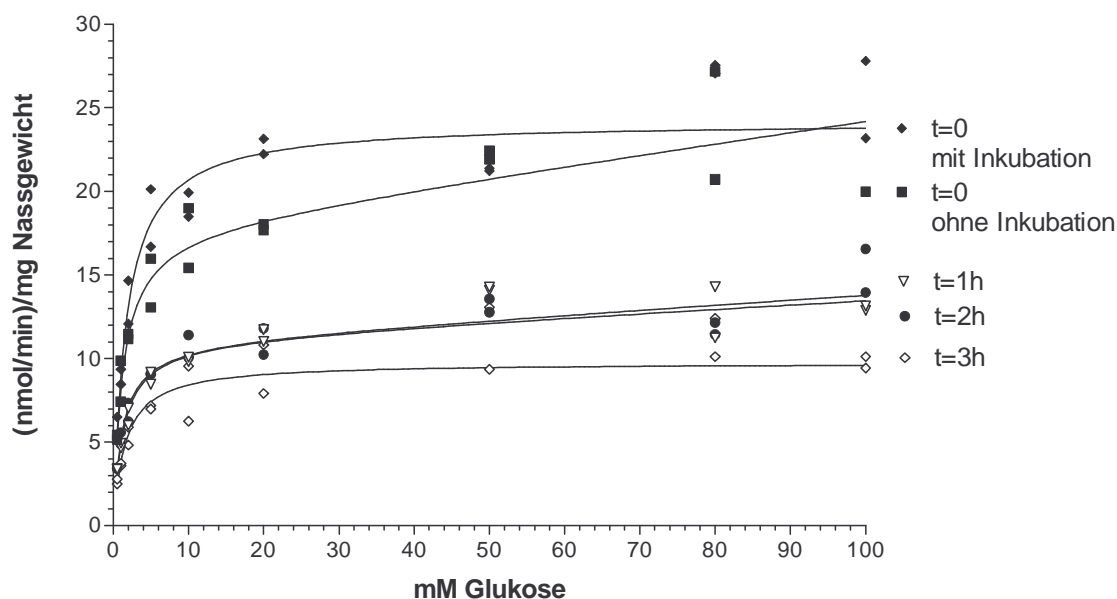
Der Verlauf der Kurven der Glukoseaufnahme in der Nullmutante RE700 nach verschiedenen Zeiten  $t$  nach der „Glukoseshift“ deutet wie vorher mit Galaktose daraufhin, dass auch hier eine Plateaubildung erfolgt.

Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min/mg)
3.6.2.1	22,51	1,96	
3.6.2.1	23,43	2,11	
3.6.2.1	24,54	2,17	
3.6.2.1	24,96	1,35	
3.6.2.1	34,05	2,05	
3.6.2.1	29,13	1,44	
3.6.2.1	23,15	1,90	
<b>7 Exp. T = 0h</b>	<b>25,97 <math>\pm</math> 4,18 SD</b>	<b>1,85 <math>\pm</math> 0,33 SD</b>	
3.6.2.1	23,14	2,35	
3.6.2.1	18,97	1,15	
<b>2 Exp. T = 0,25h</b>	<b>21,06</b>	<b>1,75</b>	
3.6.2.1	21,72	1,89	
3.6.2.1	19,80	1,82	
3.6.2.1	18,76	2,01	
3.6.2.1	17,69	1,72	
<b>4 Exp. T = 0,5h</b>	<b>19,49 <math>\pm</math> 1,72 SD</b>	<b>1,86 <math>\pm</math> 0,12 SD</b>	
3.6.2.1	11,86	2,30	
3.6.2.1	7,78	1,16	0,0660
3.6.2.1	14,44	1,89	
3.6.2.1	11,25	1,23	0,0721
3.6.2.1	12,93	1,63	
3.6.2.1	12,03	1,52	
3.6.2.1	22,29	2,20	
3.6.2.1	21,83	2,10	
<b>8 Exp. T = 1h</b>	<b>14,30 <math>\pm</math> 5,15 SD</b>	<b>1,75 <math>\pm</math> 0,44 SD</b>	
3.6.2.1	10,88	1,08	0,0682
3.6.2.1	13,87	1,60	
3.6.2.1	13,20	1,48	
3.6.2.1	11,91	1,44	
<b>4 Exp. T = 2h</b>	<b>12,47 <math>\pm</math> 1,33 SD</b>	<b>1,40 <math>\pm</math> 0,22 SD</b>	

**Tabelle 3.4.4:** Kinetische Auswertung der in Abbildung 3.4.4 dargestellten Glukosesaufnahme an der Nullmutante RE700. In drei von 25 Experimenten war zusätzlich zur Michaelis-Menten Kinetik eine Kinetik erster Ordnung nachweisbar.  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte  $\pm$  SD.

Die maximale Transportgeschwindigkeit  $V_{\max}$  beim Glukosetransport in der Nullmutante RE700 hat bis zu einer Stunde erst um 45% abgenommen und nach 2 Stunden um 52%. Die  $K_m$ -Werte liegen deutlich niedriger als bei den vergleichbaren Versuchen bei der Galaktoseaufnahme. Die mittleren  $K_m$ -Werte liegen zwischen 1,4 und 1,86 mM, also deutlich niedriger als in den Versuchen mit Galaktose.

### 3.4.5 Versuchsdauer bis drei Stunden



**Abbildung 3.4.5:** Graphische Darstellung der initialen 5-Sekunden-Aufnahme von Glukose in Zellen der Nullmutante RE700, die auf 2% Galaktose gewachsen sind. Shift auf 5% Glukose. Nachfolgend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten  $t$  die Glukoseaufnahme bestimmt. Die Zellkultur erfolgte unter aeroben Bedingungen. Die Anzahl der Experimente und die kinetischen Parameter sind der nachfolgende Tabelle 3.4.5 zu entnehmen.

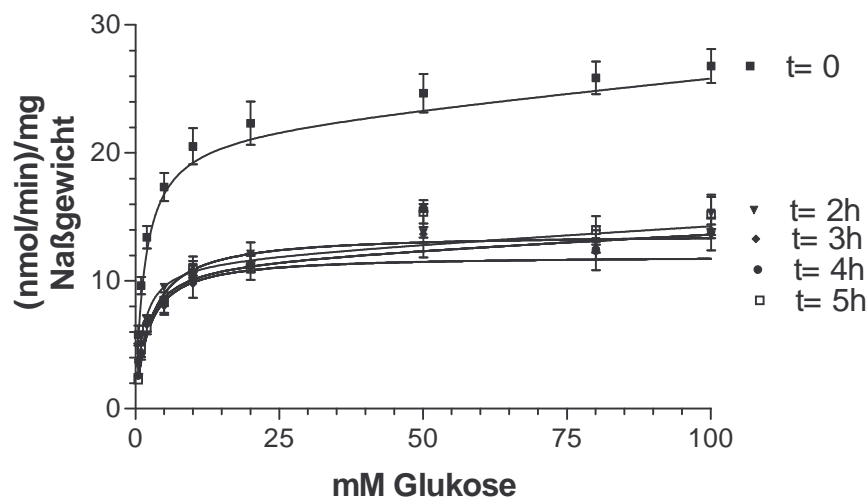
Deutlicher als in dem Versuch vorher kann bei der Glukoseaufnahme in die Zellen der Nullmutante RE700 nach „Glukoseshift“ auf eine Plateaubildung geschlossen werden. Die Auswertung des Versuchs bezüglich der Kinetik erfolgt in der Tabelle 3.4.5.

Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min/mg)
3.6.2.2	16,38	1,09	0,1402
3.6.2.2	20,02	1,40	
<b>2 Exp. T = 0 ohne</b>	<b>18,02</b>	<b>1,25</b>	
3.6.2.2	24,04	1,58	
3.6.2.2	24,23	1,78	
<b>2 Exp. T = 0 mit</b>	<b>24,14</b>	<b>1,68</b>	
3.6.2.1	12,93	1,63	
3.6.2.1	12,03	1,52	
<b>2 Exp. T = 1h</b>	<b>12,48</b>	<b>1,58</b>	
3.6.2.1	13,20	1,48	
3.6.2.1	11,91	1,44	
<b>2 Exp. T = 2h</b>	<b>12,56</b>	<b>1,46</b>	
3.6.2.2	11,52	2,05	
3.6.2.2	7,22	0,88	0,0302
<b>2 Exp. T = 3h</b>	<b>9,37</b>	<b>1,47</b>	

**Tabelle3.4.5:** Kinetische Auswertung der in Abbildung 3.4.5 dargestellten Glukoseaufnahme an der Nullmutante RE700. In 2 von 10 Experimenten war zusätzlich zur Michaelis-Menten Kinetik eine Kinetik erster Ordnung nachweisbar.  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte  $\pm$  SD.

Im Vergleich zu den 4 Nullwerten mit  $21,17 \pm 4,3$  (nmol/min)/mg Nassgewicht hat nach 3 Stunden die maximale Transportgeschwindigkeit  $V_{\max}$  beim Glukosetransport in der Nullmutante RE700 bis zu 56% abgenommen. Die  $K_m$ -Werte liegen wieder deutlich niedriger als bei den vergleichbaren Versuchen bei der Galaktoseaufnahme.

### 3.4.6 Versuchsdauer bis fünf Stunden



**Abbildung 3.4.6:**

Graphische Darstellung der initialen 5-Sekunden-Aufnahme von Glukose in Zellen der Nullmutante RE700, die auf 2% Galaktose gewachsen sind. Shift auf 5% Glukose. Nachfolgend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten  $t$  die Glukoseaufnahme bestimmt. Die Zellkultur erfolgte unter aeroben Bedingungen. Die Anzahl der Experimente und die kinetischen Parameter sind der nachfolgende Tabelle 3.4.6 zu entnehmen.

Die Versuche in der Abbildung 3.4.6 zeigen eindeutig, dass die Galaktosetransporter nach der „Glukoseshift“ nur zu etwa 50% abgebaut werden. Aus dem Verlauf der Kurven ist zu entnehmen, dass sie einem Plateau zustreben. Eine kinetische Analyse der Experimente erfolgt in der Tabelle 3.4.6.

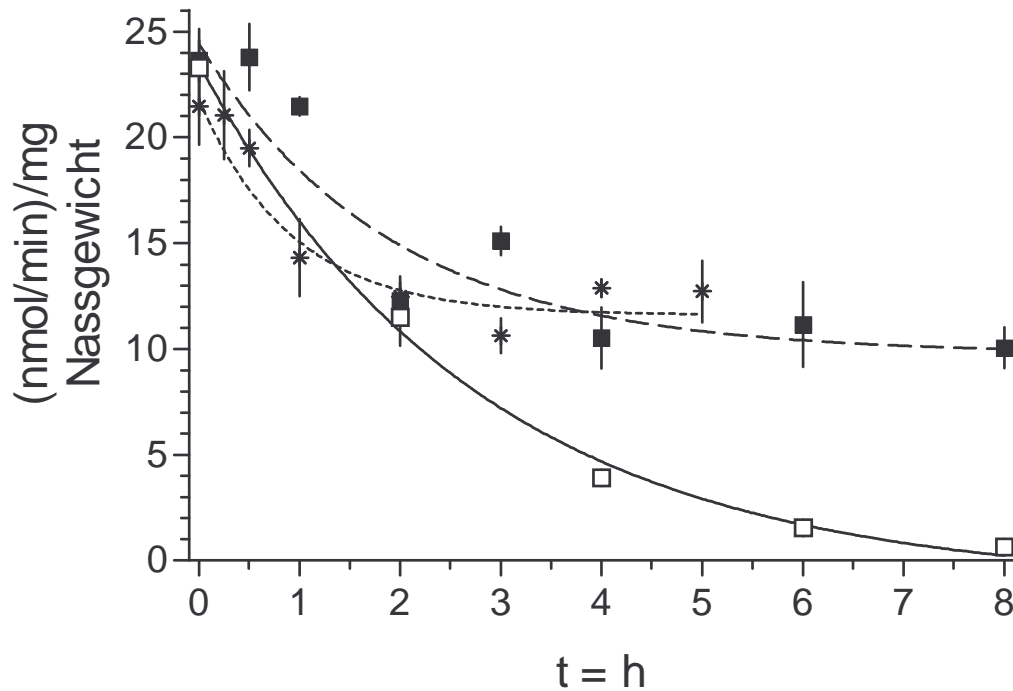
Experiment	$V_{\max}$ (nmol/min)/mg	$K_m$ (mM)	$K_d$ ( $\mu$ l/min/mg)
3.6.2.3	10,74	2,28	
3.6.2.3	10,51	2,20	
3.6.2.3	10,32	0,63	0,0748
3.6.2.3	13,41	1,22	
<b>4 Exp. T = 3h</b>	<b>11,25 <math>\pm</math> 1,45 SD</b>	<b>1,58 <math>\pm</math> 0,80 SD</b>	
3.6.2.3	13,90	2,31	
3.6.2.3	13,25	2,17	
3.6.2.3	12,19	1,87	
3.6.2.3	12,17	1,93	
<b>4 Exp. T = 4h</b>	<b>12,88 <math>\pm</math> 0,85 SD</b>	<b>2,07 <math>\pm</math> 0,21 SD</b>	
3.6.2.3	14,65	2,66	
3.6.2.3	8,41	0,93	0,0908
3.6.2.3	14,42	3,42	
3.6.2.3	13,40	2,19	
<b>4 Exp. T = 5h</b>	<b>12,72 <math>\pm</math> 2,92 SD</b>	<b>2,30 <math>\pm</math> 1,04 SD</b>	

**Tabelle 3.4.6:** Kinetische Auswertung der in Abbildung 3.4.6 dargestellten Messwerte wie vorher. 2 von 12 Experimenten lassen auf einen Term erster Ordnung (Diffusion,  $K_d$ ) schließen.

Legt man die vier 4 Nullwerte des vorhergehenden Versuches zugrunde mit  $21,17 \pm 4,3$  (nmol/min)/mg Nassgewicht, so hat nach 3 Stunden die  $V_{\max}$  auf 47%, nach 4 Stunden auf 39% und nach 5 Stunden auf 40% abgenommen. Die Plateaubildung ist in diesem Experiment besonders deutlich zu erkennen. Eine genaue Untersuchung über die Kinetik der Abnahme der  $V_{\max}$  wird in der Abbildung 3.5.1 dargestellt. Die  $K_m$ -Werte liegen hier ebenfalls deutlich niedriger als bei den vergleichbaren Versuchen bei der Galaktoseaufnahme. Eine statistische Analyse aller  $K_m$ -Werte erfolgt in der Abb. 3.5.2.

### 3.5 Zusammenfassung und Vergleich von $V_{\max}$ - und $K_m$ -Werten aus den initialen Aufnahmeversuchen am Wildtyp 996A und an der Nullmutante RE700 mit Galaktose oder Glukose als Substrat

#### 3.5.1 Zusammenfassung aller $V_{\max}$ -Werte nach „Glukoseshift“



**Abbildung 3.5.1:** Darstellung der  $V_{\max}$ -Werte in (nmol/min)/mg Nassgewicht der Zellen des Galaktosetransportes beim Wildtyp 996A (□ - □) und bei der Nullmutante RE700 (■ - ■) sowie der  $V_{\max}$ -Werte des Glukosetransportes bei der Nullmutante RE700 (\* - \*) gegen die Zeit  $t$  in Stunden (h) nach „Glukoseshift“ der Gal2 induzierten Zellen. Mittelwerte  $\pm$  SE.

Die Kurven aus den  $V_{\max}$ -Werten wurden mit Hilfe einer Gleichung 1. Ordnung berechnet. Das Resultat ist in der folgenden Tabelle dargestellt, es gibt die experimentellen Verhältnisse sehr gut wieder.



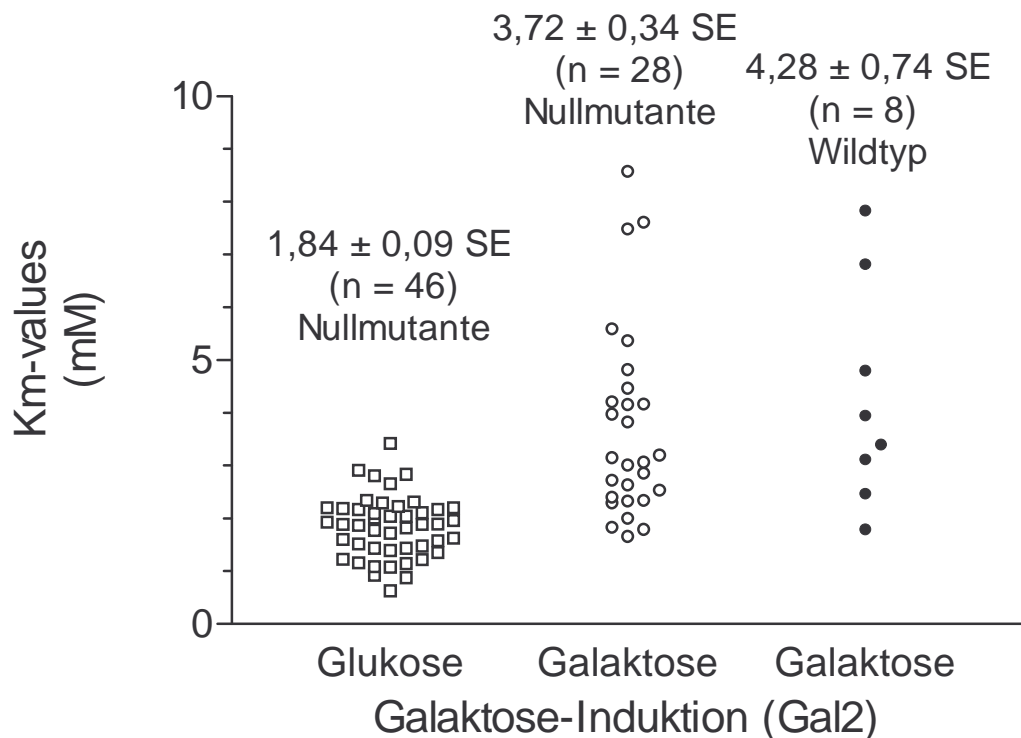
	Wildtyp 996A, Galaktosetransport	Nullmutante RE700 Galaktosetransport	Nullmutante RE 700 Glukosetransport
<b>SPAN</b>	24,59 ± 1,58	14,63 ± 1,59	10,20 ± 1,77
<b>K</b>	0,36 ± 0,06	0,53 ± 0,16	1,08 ± 0,53
<b>Plateau</b>	-1,14 ± 1,43	9,78 ± 1,31	11,60 ± 1,44
<b>Halbwertszeit</b>	1,92	1,32	0,64
<b>Korrelations- Koeffizient r<sup>2</sup></b>	0,955	0,797	0,467

**Tabelle 3.5.1:** SPAN in (nmol/min)/mg Nassgewicht, K = Geschwindigkeitskonstante, Plateau in (nmol/min)/mg Nassgewicht, Halbwertszeit in Stunden. Mittelwert ± SE.

Wie bereits bei den Experimenten in der Abbildung und Tabelle 3.5.1 festgestellt, so zeigt auch die mathematische Analyse mit Hilfe einer Gleichung 1. Ordnung, dass beim Wildtyp 996A der induzierte Gal2-Transporter vollständig abgebaut wird. Die Halbwertszeit für den Abbau von Gal2 ist in der Tabelle 3.5.1. mit einem Wert von 1,92 Stunden angegeben, der sehr nahe bei dem vorher geschätzten Wert von 2 Stunden liegt. Der Korrelationskoeffizient  $r^2$  von 0,955 gibt an, dass die Gleichung den Verlauf der experimentellen  $V_{\max}$ -Werte gut wiedergibt.

Im Gegensatz zum vollständigen Abbau beim Wildtyp 996A erfolgt bei der Nullmutante RE700 nur ein partieller Abbau des Gal2-Transporters. Die Kurven enden mit Galaktose und Glukose als Transportsubstrat auf Plateau-Werte von  $9,78 \pm 1,31$  und  $11,60 \pm 1,44$  (nmol/min)/mg Nassgewicht. Das bedeutet, dass in diesen Fällen 40% und 53% der Gal2-Transporter nicht der Katabolitinaktivierung unterliegen und funktionell intakt bleiben. Die Geschwindigkeit des partiellen Abbaues erfolgt schneller als beim Wildtyp mit K-Werten von  $0,53 \pm 0,16$  und  $1,08 \pm 0,53$  gegenüber  $0,36 \pm 0,06$ . Die entsprechenden Halbwertszeiten ( $t_{1/2} = 0,69/K$ ) sind 1,32 und 0,64 Stunden gegenüber 1,92 Stunden beim Wildtyp. Die Korrelationskoeffizienten  $r^2$  liegen bei der Nullmutante bei 0,797 und 0,467. Insbesondere der letzte niedrige Korrelationswert der  $V_{\max}$ -Werte beim Glukosetransport der Nullmutante ist auf beträchtlichen Streuungen der  $V_{\max}$ -Werte zurückzuführen.

### 3.5.2 Zusammenfassung der $K_m$ -Werte



**Abbildung 3.5.2:**  $K_m$ -Werte in mM beim Glukose- und Galaktosetransport der Nullmutante RE700 sowie  $K_m$ -Werte des Galaktosetransportes beim Wildtyp 996A. Beim Wildtyp wurden wegen des vollständigen Abbaues des Gal2-Transporters nur die Experimente bis zu zwei Stunden nach Glukose-Inkubation verwendet.

Die  $K_m$ -Werte für den Glukosetransport in der Nullmutante RE700 an 46 Einzelexperimenten ergeben im Mittel einen  $K_m$ -Wert von  $1,84 \pm 0,09$  mM. Dagegen liegen die  $K_m$ -Werte beim Galaktosetransport sowohl in der Nullmutante RE700 (28 Einzelexperimente) als auch im Wildtyp 996A (8 Einzelexperimente) etwa doppelt so hoch bei  $K_m$ -Werten mit  $3,72 \pm 0,34$  und  $4,28 \pm 0,74$  mM. Im t-Test sind diese Unterschiede zwischen Glukose- und Galaktosetransport hochsignifikant. Zwischen Glukose- und Galaktosetransport in der Nullmutante RE700 lag der P-Wert bei  $< 0,0001$  und zwischen Glukosetransport in der Nullmutante RE700 und Galaktosetransport beim Wildtyp 996A bei einem P-Wert von 0,0003 für den „two-tailed“ t-Test. Dagegen konnte kein statistischer Unterschied bei den  $K_m$ -Werten im Galaktosetransport zwischen Nulltyp RE700 und Wildtyp 996A gefunden werden ( $p = 0,493$ ).

Die  $K_m$ -Werte aus der initialen Aufnahme sind größenordnungsmäßig in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden  $K_m$ -Werten aus den Gegentransportversuchen an Plasmamembranvesikeln. So wurde beim Gegentransport mit Glukose an Plasmamembranvesikeln aus der Gal2-induzierten Nullmutante RE700 ein  $K_m$ -Wert von  $2,74 \pm 0,95$  mM (Mittelwert aus 6 Einzelexperimenten  $\pm$  SD) berechnet. Der entsprechende  $K_m$ -Wert beim Gegentransport mit Galaktose an dieser Mutante betrug 6,05 mM (Mittelwert aus 3 Versuchen). Damit sind die  $K_m$ -Werte des Galaktosetransportes beim Gegentransport und bei der initialen Aufnahme doppelt so hoch wie die entsprechenden  $K_m$ -Werte des Glukosetransportes (22,21 und 2,02). Diese Untersuchungen bestätigen einen signifikanten Unterschied in der Affinität des Gal2-Transporters gegenüber Glukose und Galaktose als Transportsubstrat.

## 4 Diskussion

Bereits 1984 haben Kreuzfeldt und Fuhrmann [Kreuzfeldt84] an präparierten Plasmamembranvesikeln aus Hefezellen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* H 1022 nach Induktion mit Galaktose einen Gegentransport von Galaktose gemessen. Diese Untersuchungen deuteten bereits früh darauf hin, dass neben dem sogenannten „konstitutiven Glucosetransporter“ auch ein induzierbarer Galaktosetransporter vom Typ des „facilitated diffusion“ Transportes in der Plasmamembran von Hefen vorhanden sein muss. Zwischen diesen damaligen Untersuchungen und den heutigen, die sich zwar in der Technik der Gegentransportuntersuchungen [Wilbrandt61] nicht wesentlich verändert haben, liegt jedoch die Aufklärung des Hefegenoms. Zu der damaligen Zeit war noch nicht bekannt, wie viele Zuckertransporter eine Hefezelle überhaupt besitzt. Erst der erfolgreiche Abschluss des Hefegenomprojekts [zitiert in Boles97] ergab, dass es 18 putative Hexosetransporter Gene HXT1-17 und GAL2, sowie 2 Hexosesensorgene SNF3 und RGT2 gibt. Für den Hexosetransport von physiologischer Bedeutung sind jedoch nur HXT1-4, HXT6-7 und GAL2 [Reifenberger95]. Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden mit der Nullmutante RE700 ohne physiologisch relevante Glucosetransportergene durchgeführt, die uns freundlicherweise von Herrn Professor Boles zur Verfügung gestellt wurde. Vor der Induktion mit Galaktose zeigt die Nullmutante keinerlei Hexosetransport (Abb. 3.1.3 und 3.2.3). Erst nach Galaktoseinkubation wird allein der Galaktosetransporter Gal2 induziert, der neben Galaktose auch Glukose transportieren kann.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach der Kinetik des Transportes von Galaktose an der mit Galaktose induzierten Nullmutante RE700 mit nur einem einzigen Hexosetransporter - dem Gal2. Aus diesen Hefezellen der Nullmutante RE700 wurden zuerst Plasmamembranvesikel präpariert, die keinen relevanten Stoffwechsel mehr besitzen. Anhand der durchgeführten Gegentransportversuche mit Galaktose (Abb. 3.1.1) konnte eindeutig festgestellt werden, dass der Gal2-Transporter allein, ohne Anwesenheit anderer Hexosetransporter, Galaktose nach dem Prinzip der „facilitated diffusion“ transportiert. Aus drei Gegentransportversuchen ließen sich für das Substrat Galaktose  $K_m$ -Werte von 6,4, 6,5 und 5,3 mM berechnen (Tab. 3.1.1).

Durch diese Versuche konnten erstmals der Mechanismus und die Kinetik des Hefetransporters Gal2 in Hefen bestimmt werden.

Der Galaktosegegentransport zeigt im Vergleich zu dem mit Glukose ein deutlich niedrigeres Gegentransportmaximum (Abb. 3.1.1 und 3.1.2), was bereits auf eine geringere Affinität von Galaktose zum Transporter hinweist. Die entsprechenden  $K_m$ -Werte des Glukosegegentransportes aus sechs Versuchen waren 3,9, 2,0, 4,0, 2,0, 2,2 und 2,3 mM (Tab. 3.1.2). Der hieraus berechnete Mittelwert von  $2,7 \pm 0,9$  mM ( $\pm$  SD) entsprach danach der Hälfte des  $K_m$ -Wertes aus dem Galaktosetransport von 6,0 mM. Dieser doppelt so hohe  $K_m$ -Wert für Galaktose im Vergleich zu dem der Glukose zeigt, dass das natürliche Substrat Galaktose eine niedrigere Affinität zum Galaktosetransporter Gal2 besitzt als Glukose.

Andreas Maier hat aus seinen Gegentransportversuchen mit Glukose in präparierten Plasmamembranvesikeln aus der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion einen  $K_m$ -Wert für Glukose von 1,5 mM (Mittelwert aus 2 Versuchen) berechnet [Maier01]. Dieser  $K_m$ -Wert für Glukose liegt in der Streubreite der obigen  $K_m$ -Werte von  $2,7 \pm 0,9$  mM.

Auch bei den initialen Aufnahmeversuchen an intakten Hefezellen der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion wurde eine ebenso hohe Differenz der  $K_m$ -Werte zwischen dem Transport von Galaktose und Glukose gemessen (Abb. 3.5.2). Aus 28 Einzelversuchen ergab die kinetische Bestimmung einen  $K_m$ -Wert von  $3,7 \pm 0,3$  mM (Mittelwert  $\pm$  SE) für den Galaktosetransport. Dieser  $K_m$ -Wert war doppelt so hoch wie der bei der initialen Glukoseaufnahme mit  $1,8 \pm 0,1$  mM (46 Einzelversuche, Mittelwert  $\pm$  SE). Im t-Test („two-tailed“) erwies sich dieser Unterschied als hochsignifikant mit einem P-Wert  $< 0,0001$ .

Der niedrige  $K_m$ -Wert von  $1,8 \pm 0,1$  mM bei der initialen Glukoseaufnahme liegt im Bereich der  $K_m$ -Werte aus den Gegentransportversuchen von Maier mit 1,5 mM und liegt auch mit dem hier berechneten Mittelwert-Wert von  $2,7 \pm 0,9$  mM im Einklang.

Der erhobene  $K_m$ -Wert (Mittelwert  $\pm$  SE) aus der initialen Galaktoseaufnahme von  $3,7 \pm 0,3$  mM (Abb. 3.5.2) liegt ebenfalls im Streubereich der  $K_m$ -Werte von 6,4, 6,5 und 5,3 mM aus den Galaktosegegentransportversuchen. Dagegen gibt es keine Übereinstimmung mit den beschriebenen  $K_m$ -Werten für Galaktose von Bisson et al. [Bisson93]. Diese Autoren fanden bei der initialen Galaktoseaufnahme zwei  $K_m$ -Werte von 0,8 und 25 mM.

In unseren Versuchen zeigte auch der  $K_m$ -Wert für Galaktose bei der initialen Aufnahme an Zellen des Wildtyps 996A (Abb. 3.5.2) einen vergleichbaren hohen  $K_m$ -Wert mit  $4,3 \pm 0,7$  mM (Mittelwert  $\pm$  SE) wie für Galaktose an der Nullmutante RE700 mit  $3,7 \pm 0,3$  mM. Die  $K_m$ -Werte sind nicht signifikant verschieden. Sie unterscheiden sich jedoch signifikant von den  $K_m$ -Werten bei der initialen Glukoseaufnahme in der Nullmutante RE700.

Betrachtet man die  $V_{max}$ -Werte sowohl beim initialen Glukosetransport als auch beim initialen Galaktosetransport in der Nullmutante RE700 und beim initialen Galaktosetransport im Wildtyp 996A (Abb. 3.5.1), so liegen sie alle in der gleichen Größenordnung mit  $23,5 \pm 2,5$ ,  $21,5 \pm 6,7$ , und  $23,3 \pm 3,6$  (nmol/min)/mg Nassgewicht. Die gleichen  $V_{max}$ -Werte weisen darauf hin, dass es sich beim Glukose- und Galaktosetransport in der Nullmutante RE700 als auch im Wildtyp 996A um das gleiche Transportsystem, nämlich dem Galaktosetransporter, handelt. Daraus kann man schließen, dass Wildtyphefzellen beim Wachstum auf Galaktose hauptsächlich den Galaktosetransporter induzieren und die früheren Versuche von Kreutzfeldt und Fuhrmann hätten danach schon damals den Galaktosetransporter Gal2 in Hefen charakterisiert [Kreutzfeldt84].

Die funktionellen Eigenschaften von Gal2 in Hefen bezüglich der Substrate Galaktose und Glukose ließen vermuten, dass möglicherweise eine strukturelle Verwandtschaft mit dem tierischen Glukosetransporter Glut1 besteht. Der  $K_m$ -Wert für den Glukosetransport in menschlichen Erythrozyten Glut1 wird bei 20° C mit 1,6 mM und 2,4 mM angegeben [Stein90] [Fuhrmann89(2)] und ist somit in der Tat vergleichbar mit dem entsprechenden  $K_m$ -Wert des Gal2 in den Hefezellen. Dagegen weichen die  $K_m$ -Werte für Galaktose beträchtlich ab, obwohl auch beim Glukosetransporter Glut1 in

menschlichen Erythrozyten eine geringere Affinität für Galaktose registriert wurde. Der  $K_m$ -Wert von 12 mM [Stein90] ist aber deutlich höher, als die von uns am Galaktosetransporter Gal2 gemessenen  $K_m$ -Werte (Gegentransport 6 mM, initiale Aufnahme  $3,7 \pm 0,3$  mM).

Weitere Unterschiede bestehen darin, dass der Glut1 eine deutliche Asymmetrie des Glukosetransportes aufweist, und Gal2 in Hefen keine solche Asymmetrie erkennen lässt [Fuhrmann89(2)]. Aus den größenordnungsmäßig gleichen  $K_m$ -Werten bei der initialen Aufnahme und dem Gegentransport geht kein asymmetrisches Verhalten hervor. Schließlich sind die für den Glukosetransporter Glut1 wirksamen Inhibitoren wie Cytochalasin B etc. unwirksam beim Hexosetransport in Hefen [Fiechter81].

Kasahara et al. geben darüber hinaus eine unterschiedliche Substrataffinität von Gal2 und Glut1 mit folgender Reihenfolge der bevorzugten Hexosen an. Danach bevorzugt Gal2 folgende Hexosen in angegebener Reihenfolge: D-Glukose  $\geq$  D-Galaktose  $>$  2-Deoxy-D-Glukose  $>$  D-Fruktose  $\gg$  3-O-Methyl-D-Glukose. Für Glut1 ergibt sich die Reihenfolge: D-Glukose  $>$  2-Deoxy-D-Glukose  $\geq$  3-O-Methyl-D-Glukose  $>$  D-Galaktose  $\gg$  D-Fruktose [Kasahara98].

Auf der Suche nach möglichen strukturellen Übereinstimmungen von Gal2 und Glut1 fanden Kasahara et al. in der putativen Membrandomäne 10 des Glut1 zwei aromatische Aminosäuren Phe<sup>379</sup> und Trp<sup>388</sup>, die Tyr<sup>446</sup> und Trp<sup>455</sup> im Gal2 entsprachen [Kasahara98]:

```

Glut1 -I V A I F G F V A F F379 E V G P G P I P W388 F-
Gal2  -I V F T C F Y I F C Y446 A T T W A P V A W455 V-
Hxt2  -I V F T C L F I F F F431 A I S W A P I A Y440 V-

```

Die beiden Aminosäuren Tyr<sup>446</sup> und Trp<sup>455</sup> im Gal2 haben sich dabei als unersetzlich und wichtig für die Erkennung von Galaktose erwiesen. Dies geht insbesondere aus der Tatsache hervor, dass der Austausch im Hefeglukosetransporter Hxt2 von F<sup>431</sup> und Y<sup>440</sup> gegen Tyr<sup>446</sup> und Trp<sup>455</sup> einen Galaktosetransport im Hxt2 bewirkte [Kasahara98]. Aus Aminosäureaustausch-Versuchen in diesen Positionen am tierischen

Glukosetransporter Glut1 zeigte sich jedoch, dass die Aminosäuren Phe<sup>379</sup> und Trp<sup>388</sup> im Glut1 essentiell für den Glukosetransport sind. Somit sind die Strukturen für die Erkennung von Galaktose im Glut1 im Gegensatz zum Gal2 weiterhin unbekannt.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der sogenannten „Glukoseshift“. Dabei wurden die mit Galaktose induzierten Hefezellen auf ein Glukosemedium umgesetzt. Beim Wildtyp wird durch die Anwesenheit von Glukose eine Repression von Enzymen hervorgerufen und die Leloir-Enzyme werden irreversibel katabolisch durch Proteolyse abgebaut. Der Transporter Gal2 selbst verschwindet dabei vollständig aus der Plasmamembran und sein Transport ist nicht mehr nachweisbar. Dies ist auch der Fall beim Wildtyp 996A (Abb. 3.5.1). Hier wird der induzierte Galaktosetransporter Gal2 anhand seiner  $V_{\max}$ , die proportional zu der Anzahl der Transporter ist, gemessen. Der Abbau erfolgt exponentiell (Korrelationskoeffizient 0,955) mit einem K-Wert von  $0,36 \pm 0,06$  und einer Halbwertszeit von 1,92 Stunden, sodass nach etwa 8 Stunden fast kein Galaktosetransport mehr nachzuweisen ist (Abb. 3.5.1). Dieses Verhalten und der zeitliche Ablauf entspricht in etwa den Werten von Galindez et al. an Hefezellen des Stammes *Saccharomyces carlsbergensis* G-517 in kontinuierlicher Kultur [Galindez83]. Horak et al. ermittelten dagegen eine etwas längere Halbwertszeit von etwa 3,5 Stunden bei Zellen des Wildtyps WCG4 $\alpha$  [Horak97]. Der Unterschied in der Halbwertszeit liegt möglicherweise an der Verwendung unterschiedlicher Hefestämme.

Im Vergleich zu den Wildtyp-Hefezellen zeigt die Nullmutante RE700 beim „Glukoseshift“ ein signifikant anderes Verhalten, es wird nämlich nur etwa die Hälfte der induzierten Galaktosetransporter abgebaut. Wie in der Abbildung 3.5.1 zu erkennen ist, strebt die Abnahme der  $V_{\max}$  bei den Versuchen mit der Nullmutante auf ein Plateau zu. Es werden in diesen Versuchen 40% bis 53% der Galaktosetransporter nicht abgebaut und bleiben aktiv. Auch die Geschwindigkeit des Teilabbaues der Galaktosetransporter ist schneller als beim Wildtyp 996A. Auf Grund der Streuung lässt sich jedoch hierbei keine exakte Kinetik bestimmen.

Das Phänomen der Plateaubildung wurde in dieser Weise bisher noch nicht beobachtet und es ist nicht bekannt, warum die Nullmutante RE700 ihre Galaktosetransporter nicht vollständig abbaut wie das der entsprechende Wildtyp zeigt. Jedes extrazelluläre Signal



muss von der Zelle registriert, weitergeleitet und in eine biochemische Antwort umgesetzt werden. Die chemische Natur des Signals, welches den Glukose-induzierten Abbau von Gal2 bewirkt, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Möglicherweise ist die Signalsequenz bei der Nullmutante RE700 teilweise nicht mehr intakt, so dass die Inaktivierung des Gal2 nicht vollständig funktioniert. Vielleicht ist auch durch das Entfernen der Gene für die Glukosetransporter zur Herstellung der Nullmutante RE700, das empfindliche Zusammenspiel der verschiedenen Leloir-Enzyme bei der „Downregulierung“ des Gal2 in der Zelle gestört. Horak et al. konnten z. B. zeigen, dass bei bestimmten Mutanten mit einem endozytotischen Defekt die Galaktosetransporter nicht abgebaut werden [Horak97]. Weiterhin ist denkbar, dass durch Ausfall der Glukosetransporter als Regulativ bei der Nullmutante ein noch nicht bekannter „Selbsterhaltungstrieb“ die Katabolitinaktivierung nach gewisser Zeit stoppt. Zur Abklärung dieses interessanten Phänomens sind weitere Versuche notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Galaktose-Gegentransportmessungen an Plasmamembranvesikeln präpariert aus mit Galaktose induzierten Zellen der Nullmutante RE700 ergaben folgende  $K_m$ -Werte: 6,4, 6,5 und 5,3 mM. Damit ist zum erstenmal eindeutig der Mechanismus des „facilitated diffusion“ Transportes und die Kinetik des Galaktosetransporters Gal2 der Hefe bestimmt worden.

Der Galaktosegegentransport an Plasmamembranvesikeln präpariert aus der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion zeigt im Vergleich zu dem mit Glukose ein deutlich niedrigeres Gegentransportmaximum, was bereits auf eine geringere Affinität von Galaktose zum Gal2 hinweist. Die entsprechenden  $K_m$ -Werte aus sechs Versuchen des Glukose-Gegentransportes waren 3,9, 2,0, 4,0, 2,0, 2,2 und 2,3 mM. Der hieraus berechnete Mittelwert von  $2,7 \pm 0,4$  mM entsprach damit der Hälfte des  $K_m$ -Wertes aus dem Galaktosegegentransport mit 6,0 mM.

Eine ebenso große Differenz der  $K_m$ -Werte zwischen dem Transport von Galaktose und Glukose konnte bei initialen Aufnahmeversuchen an Zellen der Nullmutante RE700 nach Galaktose-Induktion erhoben werden. Aus 28 Einzelversuchen mit Galaktose als Transportsubstrat ergab sich ein  $K_m$ -Wert von  $3,7 \pm 0,3$  mM, der damit doppelt so hoch wie der bei der initialen Glukoseaufnahme lag mit einem  $K_m$ -Wert von  $1,8 \pm 0,1$  mM (46 Versuche). Im t-Test („two-tailed“) erwies sich dieser Unterschied als hochsignifikant mit einem P-Wert  $< 0,0001$ . Der niedrige  $K_m$ -Wert von  $1,8 \pm 0,1$  mM bei der initialen Glukoseaufnahme bestätigt den berechneten  $K_m$ -Wert aus den Gegentransportversuchen von Maier mit 1,5 mM und liegt auch mit dem hier erhobenen  $K_m$ -Wert von  $2,7 \pm 0,4$  mM im Einklang.

Der  $K_m$ -Wert des initialen Galaktosetransportes beim Wildtyp 996A nach Galaktose-Induktion betrug in 8 Einzelversuchen  $4,3 \pm 0,7$  mM und war somit nicht signifikant verschieden von dem entsprechenden  $K_m$ -Wert der Nullmutante RE700 mit  $3,7 \pm 0,3$  mM.

Die niedrigen  $K_m$ -Werte für Glukose mit 1,8 mM am Gal2-Transporter der Hefe sind in Übereinstimmung mit entsprechenden  $K_m$ -Werten des menschlichen Glukosetransporters Glut1 aus der Literatur mit 1,6 und 2,4 mM [Stein90] [Fuhrmann89(1)]. Dagegen sind die  $K_m$ -Werte für den Galaktosetransport mit 6 und 3,7 mM am Gal2 Transporter der Hefe deutlich verschieden gegenüber dem  $K_m$ -Wert von 12 mM beim menschlichen Glut1 Transporter. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass der Hefetransporter Gal2 kein asymmetrisches Transportverhalten wie der menschliche Glut1 beim Erythrozyten aufweist. Damit ist nicht nur die Struktur sondern auch die Funktion beider Transporter verschieden.

Durch die Anwesenheit von Glukose („Glukoseshift“) wird eine Repression von Enzymen hervorgerufen. Beim Wildtyp 996A verschwindet der induzierte Galaktosetransporter Gal2 wieder vollständig. Der Abbau erfolgt exponentiell (Korrelationskoeffizient 0,955) mit einem K-Wert von  $0,36 \pm 0,06$  und einer Halbwertszeit von 1,92 Stunden, sodass nach etwa 8 Stunden fast kein Galaktosetransport mehr nachzuweisen ist. Dieses Verhalten und der zeitliche Ablauf entsprechen in etwa den Angaben aus der Literatur [Galindez83] [Horak97].

Im Vergleich zu den Wildtyp-Hefezellen zeigt die Nullmutante RE700 beim „Glukoseshift“ ein signifikant anderes Verhalten, es wird nämlich nur etwa die Hälfte der induzierten Galaktosetransporter abgebaut. Dabei strebt die Abnahme der Galaktosetransporter auf ein Plateau zu. Es werden in diesen Versuchen 40 bis 53% der Galaktosetransporter nicht abgebaut und bleiben aktiv. Dabei ist die Geschwindigkeit des Teilabbaues der Galaktosetransporter schneller als beim Wildtyp 996A. Auf Grund der Streuung lässt sich jedoch hierbei keine exakte Kinetik bestimmen.

Das Phänomen der Plateaubildung wurde in dieser Weise bisher noch nicht beobachtet und es ist nicht bekannt, warum die Nullmutante RE700 ihre Galaktosetransporter nicht vollständig abbaut wie Wildtypen der Hefen. Möglicherweise ist durch das Entfernen der Gene für die Glukosetransporter das empfindliche Zusammenspiel der verschiedenen Leloir-Enzyme bei der „Downregulierung“ des Gal2 in der Zelle gestört. Es ist außerdem vorstellbar, dass durch Ausfall der Glukosetransporter als Regulativ bei der Nullmutante ein noch nicht bekannter „Selbsterhaltungstrieb“ die

---

Katabolitinaktivierung des Galaktosetransporters nach gewisser Zeit stoppt. Zur Abklärung dieses interessanten Phänomens sind weitere Versuche notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

- [Baldwin93] **Baldwin, S.A.:** „Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins“  
Biochem. Biophys. Acta 1154: 17-49; (1993)
- [Bisson93] **Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L., Lewis, D.A.:** „Yeast sugar transporters“  
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28: 259-308; (1993)
- [Boles97] **Boles, E., Hollenberg, C.P.:** „The molecular genetics of hexose transport in yeasts“  
FEMS Microbiology Reviews 21: 85-111; (1997)
- [Ciriacy97] **Ciriacy, M., Reifenberger, E.:** „Hexose transport, in Yeast sugar metabolism  
Zimmermann,FK & Entian KD, eds; Technomic Publishing Co, Lancaster PA, in the press
- [Fiechter81] **Fiechter, A., Fuhrmann, G.F., Käppeli, O.:** „Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells“  
Adv. Mikrobiol. Physiol.22, 123-183;(1981)
- [Fuhrmann76] **Fuhrmann, G.F., Böhm, C., Theuvenet, A.P.R.:** „Sugar transport and potassium permeability in yeast plasma membrane vesicles“  
Biochem. Biophys Acta 493: 583-596 ; (1976)
- [Fuhrmann89(1)] **Fuhrmann, G.F., Völker, B., Sander, B., Potthast, M.:** „Kinetic analysis and simulation of glucose transport in plasma membrane vesicles of glucose-repressed and derepressed *Saccharomyces cerevisiae* cells“  
Experientia 45: 1018-1023; (1989)

- [Fuhrmann89(2)] **Fuhrmann, G.F.:** „Transport studies in red blood cells“  
Methods Enzymol. 173: 263-280; (1989)
- [Fuhrmann92] **Fuhrmann, G.F., Völker, B.:** „Regulation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*“  
J. Biotech.27, 1-15; (1992)
- [Galindez83] **Galindez, M.J., Ruiz Ordaz, N., Herrero, P., Moreno, F.:**  
„Transient responses of yeast continuous cultures to qualitative changes in the nutrient supply. Induction and repression of the galactose pathway enzymes“  
Arch. Microbiol. 135: 115-119; (1983)
- [Holzer76] **Holzer, H.:** „Catabolite inactivation in yeast“  
Trends Biochem. Sci. 1: 178-181; (1976)
- [Horak97] **Horak, J., Wolf, D.H.:** „Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole“  
J Bacteriol.179: 1541-1549; (1997)
- [Horak02] **Horak, J., Regelmann, J., Wolf, D.H.:** „Two distinct proteolytic systems responsible for glucose-induced degradation of fructose-1,6-biphosphatase and the Gal2p transporter in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* share the same protein components of glucose signaling pathway“  
J Bacteriol.227(10): 8248-8254; (2002)
- [Kasahara96] **Kasahara, M., Shimoda, E., Maeda, M.:** „Transmembrane segment 10 is important for substrate recognition in Gal2 and Hxt2 sugar transporters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*“  
FEBS Lett. 398: 174-178; (1996)
- [Kasahara 97] **Kasahara, M., Shimoda, E., Maeda, M.:** „Amino acid residues responsible for galactose recognition in yeast Gal2 transporter“  
J. Biol. Chem.272(27): 16721-16724; (1997)

- [Kasahara98] **Kasahara, T., Kasahara, M.:** „Tryptophan 388 in putative transmembrane segment 10 of rat glucose transporter Glut1 is essential for glucose transport”  
J. Biol. Chem. 273(44): 29113-7; (1998)
- [Kasahara/Maeda98] **Kasahara, M., Maeda, M.:** „Contribution to substrate recognition of two aromatic amino acid residues in putative transmembrane segment 10 of the yeast sugar transporters Gal2 and Hxt2”  
J. Biol. Chem. 273(44): 29106-12; (1998)
- [Kasahara00(1)] **Kasahara, T., Kasahara, M.:** „Three aromatic amino acid residues critical for galactose transport in yeast Gal2 transporter”  
J. Biol. Chem. 275(6): 4422-4428; (2000)
- [Kasahara00(2)] **Kasahara, T., Kasahara, M.:** „Interaction between the critical aromatic amino acid residues Tyr(352) and Phe(504) in the yeast Gal2 transporter”  
FEBS Lett. 471(1): 103-7; (2000)
- [Kreutzfeld84] **Kreutzfeldt, Ch., Fuhrmann, G.F.:** „Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae* H 1022“.  
Swiss Biotech. 2: 24-27; (1984)
- [Kruckeberg96] **Kruckeberg, A.L.:** „The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*”  
Arch. Microbiol.166:283-293; (1996)
- [Lagunas93] **Laguna,s R.:** „Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*”  
FEMS Microbiology Reviews 104: 229-242; (1993)
- [Maier01] **Maier, A.W.:** „Kinetische Charakterisierung einzelner Glucosetransporter der Mutanten HXT1, HXT2, HXT3, HXT4, HXT6 und HXT7 von *Saccharomyces cerevisiae*“  
Dissertation 2001

- [Maier02] **Maier, A.W., Völker, B., Boles, E., Fuhrmann, G.F.:** „Characterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters”  
FEMS Yeast Research 2: 539-550; (2002)
- [Mueckler85] **Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blech, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E., Lodish, H.F.:** „Sequence and structure of a human glucose transporter”  
Science 229(4717):941.945;(1985)
- [Nishizawa95] **Nishizawa, K., Shimoda, E., Kashara, M.:** „Substrate recognition domain of the Gal2 galactose transporter in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as revealed bei chimeric galactose-glucose transporters”  
J.Biol.Chem.270(6): 2423-6; (1995)
- [Özcan99] **Özcan, S., Johnston, M.:** „Function and regulation of Yeast hexose transporters”  
Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 554-569 (1999)
- [Reifenberger95] **Reifenberger, E., Freidel, K., Cirillo, V.P.:** „Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux”  
Mol.Microbiol.16:157-167; (1995)
- [Rosenberg57] **Rosenberg, T., Wilbrandt, W.:** „Uphill transport induced by counterflow”  
J.Gen.Physiol.41: 289-296; (1957).



- [Saetter98]           **Saetter, M.J., De la Rue, S.A., Porter, L.M., Gould, G.M.:**  
„QLS motif in transmembrane helix VII of the glucose  
transporter family interacts with the C-1 position of D-glucose  
and is involved in substrate selection at the exofacial binding  
site”  
  
Biochemistry 37: 1322-1326; (1998)
- [Stein 90]           **Stein, W.D.:** „Channels, carriers and pumps”  
  
Academic Press, pp.137; (1990)
- [Widdas89]           **Widdas, W.F.:** „Sugar transport in red blood cells”  
  
Methods Enzymol. 173: 231-50; (1989)
- [Wilbrandt61]       **Wilbrandt, W., Rosenberg, T.:** „The concept of carrier  
transport and its corollaries in pharmacology”  
  
Pharmacol.Rev.13: 109-183; (1961)
- [Wilson96]           **Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G.:** “Glucose  
repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase  
is activated by phosphorylation under derepressing conditions,  
and this correlates with a high AMP:ATP ratio”  
  
Curr.Biol.6: 1426-1434; (1996)
- [Völker97]           **Völker, B., Martin, H.J., Michealis, D., Fuhrmann G.F.:** „Is  
there a channel for glucose in the plasma membrane?”  
  
Folia Microbiol.42(3): 250-251; (1997)
- [Zenke96]           **Zenke, F., Engels, R., Vollenbroich, V., Meyer, J.,  
Hollenberg, C.P., Breunig, K.:** „Activation of Gal4p by  
galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p”  
  
Science 272: 1662-1665; (1996)

## 7 Anhang

### 7.1 Lebenslauf

#### **Persönliche Daten:**

Name: Bruneß  
Vornamen: Christina  
Geburtsdatum: 19.09.1973  
Geburtsort: Lönigen  
Verheiratet seit: 30.03.2001  
Kinder: Jonathan Paul, geb. 21.03.2000  
Maria Lili, geb. 01.03.2003  
Eltern: Mutter: Agnes Bruneß, Grundschullehrerin  
Vater: Rainer Bruneß, Fregattenkapitän  
Geschwister: Elisabeth Bruneß, Grundschullehrerin

#### **Schulische Ausbildung:**

1980 - 1984 Grundschule Osterstraße, Varel  
1984 - 1993 Lothar-Meyer-Gymnasium, Varel  
1993 Allgemeine Hochschulreife  
  
08/93-08/94 Freiwilliges soziales Jahr im Henriettenstift in Hannover  
(Diakonisches Werk)

**Hochschulausbildung:**

10/1994	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
08/96	Ärztliche Vorprüfung
03/98	1. Staatsexamen Humanmedizin
04/00	2. Staatsexamen Humanmedizin
10/02	3. Staatsexamen Humanmedizin

**Promotion:**

05/1997	Beginn der Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, der Philipps-Universität Marburg
---------	---

**Berufliche Tätigkeit:**

Ab 10/94	Hospitation im Krankenhaus St. Johannes Hospital ,Varel, Abteilung Gynäkologie Pflegetätigkeit im Altenheim Langendamm, Varel
02/97	Famulatur im St.-Johannes Hospital/Varel, Abteilung Innere Medizin
07/98-09/98	Famulaturen im R.C. Andara Hospital, Namibia und Windhoek State Hospital, Namibia
seit 10/98	Ausbildung in traditioneller chinesischer Medizin in Hamburg bei der Societas Medicinae Sinensis (SMS)
03/99	Famulatur in der Bernhard-Weiss-Klinik, Kredenbach, Abteilung Innere Medizin
07/99	Kurs in traditioneller chinesischer Medizin in Beijing/China
10/04	Assistenzärztin im St.-Johannes Hospital Varel, Innere Medizin

## 7.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren

Prof. Dr. R. Arnold, Prof. Dr. G. Aumüller, Prof. Dr. Dr. H.-D. Basler, Prof. Dr. E. Baum, Prof. Dr. M. Beato, Prof. Dr. R. E. Eckhorn, Prof. Dr. P. Engel, Prof. Dr. C. Eschenbach, Prof. Dr. G. F. Fuhrmann, Prof. Dr. H. Ganz, Prof. Dr. A. Geus, Prof. Dr. L. Gotzen, Prof. Dr. A. M. Gressner, Prof. Dr. P. Griss, Prof. Dr. A. Habermehl, Prof. Dr. R. Happle, Prof. Dr. G. Huffmann, Prof. Dr. H. F. Kern, Prof. Dr. O. Kleinsasser, Prof. Dr. H.-D. Klenk, Prof. Dr. K. J. Klose, Prof. Dr. J.-C. Krieg, Prof. Dr. P. Kroll, Prof. Dr. R. E. Lang, Prof. Dr. H. Lennartz, Prof. Dr. E. Meyer-Breiting, Prof. Dr. R. Moosdorf, Prof. Dr. H. Netter, Prof. Dr. W. H. Oertel, Prof. Dr. M. Pohlen, Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt, Prof. Dr. H. Riedmiller, Prof. Dr. M. Rothmund, Prof. Dr. D.-O. Schachtschabel, Prof. Dr. H. Schäfer, Prof. Dr. K.-D. Schulz, Prof. Dr. Dr. G.-H. Schumacher, PD Dr. Schweigerer, Prof. Dr. Dr. K.-H. Seifart, Prof. Dr. J. Seitz, Prof. Dr. Siegrist, Prof. Dr. B. Steiniger, Prof. Dr. C. Thomas, PD Dr. H.-W. Vohland, Prof. Dr. P. v. Wichert.

Meine akademischen Lehrer an der Georg-August-Universität Göttingen waren die Herren:

Prof. Dr. F. A. Bahmer, Prof. Dr. M. Dürig, PD Dr. S. Theissen

### 7.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. G. F. Fuhrmann für die Überlassung des Themas herzlich danken. Ich bin ihm sehr dankbar für seine sehr gute persönliche Betreuung, sein ausgesprochenes Engagement und zahlreichen Hilfestellungen im Hinblick auf alle in dieser Dissertationsschrift auftretenden Fragen. Insbesondere seine Geduld und sein Verständnis für die Schwierigkeiten als Mutter von kleinen Kindern meine Arbeit außerhalb des universitären Umfeldes fertig zu stellen, ist hier besonders hervorzuheben.

Mein Dank gilt weiter den Herren Bernhard Völker und Dr. Hans-Jörg Martin, die mich tatkräftig in alle Bereiche der Laborarbeit und damit verbundenen Computerarbeit einarbeiteten und mir stets geduldige, kompetente und hilfsbereite Ansprechpartner waren. Besonders Herrn Bernhard Völker möchte ich hervorheben, der mir zusätzlich für die Betreuung zahlreicher Nachtschichten stets zur Seite stand.

Sowie Frau Helga Radler für die Vesikelpräparation.

Natürlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie für die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima bedanken, insbesondere bei Herrn Dr. Andreas Meier, der mir als humorvoller Oberdotorand aus dieser Zeit in guter Erinnerung geblieben ist.

Mein Dank gilt auch Herrn Eckhard Boles aus dem Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf für die freundliche Überlassung der verwendeten Hefestämme.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann Dr. Florian Bruness auch auf diesem Wege einen tiefen Dank aussprechen. Ohne Arbeitsteilung in familiären Dingen, seine Geduld bezüglich seiner gestressten Ehefrau, der kompetenten Hilfe am Computer und dem leisen Druck seinerseits in der Endphase dieser Arbeit, wäre sie wohl kaum fertig geworden.