1 Einleitung

1.1 Zuckerstoffwechsel von Saccharomyces cerevisiae

Die Hefe Saccharomyces cerevisiae bevorzugt, wie der Name schon andeutet, Zucker als Kohlenstoff-Quelle zur Aufrechterhaltung ihres Energie- und Baustoffwechsels. Dabei ist sie nicht nur auf Saccharose beschränkt, vielmehr bevorzugt sie Glucose vor allen anderen C-Quellen. Ist Glucose im Medium vorhanden, wird diese über die Glycolyse zu Kohlendioxid und Ethanol abgebaut. Unter diesen Wachstumsbedingungen besteht fast die Hälfte aller Proteine der Zelle aus Enzymen der Glycolyse. Die Verwertung anderer Kohlenstoffquellen wird in diesem Fall aktiv unterdrückt. Die Glucoserepression (siehe 1.4 zur Regulation) wirkt sich vor allem auf die Transkriptionsfaktoren für die Gene der Verwertung alternativer Kohlenstoff-Quellen aus, wobei z. B. GAL4 (Nehlin und Ronne, 1990; Nehlin, et al., 1991, Griggs, et al., 1991 und Frolova, et al., 1999), MAL83 (Hu, et al., 1995; Klein, et al., 1996 und Hu, et al., 2000), HAP2 und HAP4 (Forsburg, et al., 1989 und Lundin, et al., 1994) sowie CAT8 (Hedges, et al., 1995 und Rahner, et al., 1996) zu nennen sind. Durch die Repression dieser Transkriptionsfaktoren wird der gesamte Stoffwechselweg zum Abbau der entsprechenden Kohlenstoffquellen unterdrückt. Nach vollständigem Verbrauch der im Medium vorhandenen Glucose wird die Glucoserepression in den Zellen aufgehoben. Dies unter anderem zu einer Induktion der Gene der bereits Transkriptionsfaktoren. Zur Unterscheidung verschiedener Kohlenstoffquellen ist aber noch eine, meist posttranslationale, Aktivierung der Transkriptionsfaktoren notwendig. Dies ist am Beispiel des GAL4 Transkriptionsfaktors (Sadowski, et al., 1996 und Rhode, et al., 2000) sehr genau untersucht. Bei der posttranslationalen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren unterscheidet die Hefe Saccharomyces cerevisiae sehr genau zwischen fermentierbaren, zuerst verwerteten, und nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Die Umstellung von nichtfermentativen auf fermentativen Stoffwechsel und umgekehrt bedingt also eine Reihe verschiedenster Regulationsprozesse. Im Folgenden soll zuerst die Regulation bei Umstellung von nicht-fermentativem zu fermentativem Wachstum, wie Glucoseinaktivierung von Proteinen. gezielter glucoseinduzierter mRNA-Abbau und Glucoserepression Mechanismus der Genregulation dargestellt werden.

1.2 Glucoseinaktivierung

Wird Saccharomyces cerevisiae auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen angezogen und auf glucosehaltiges Medium umgesetzt, kommt es zur Glucoseinaktivierung. Darunter versteht man die irreversible Inaktivierung und Proteolyse nicht an der Verwertung von Glucose beteiligter Enzyme (Holzer, 1976). Von dieser Glucoseinaktivierung sind z.B. alle Schlüsselenzyme der Gluconeogenese (Holzer, 1979 und Zubenko, et al.; 1979) wie z.B. Phosphoenolpyruvatcarboxykinase Pck1p (Gancedo und Schwerzmann, 1976, Haarasilta und Oura, 1975, Matern, 1979 und Müller, et al., 1981), aber auch die Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zykluses Isocitratlyase Icl1p (Duntze, et al., 1968, Lopez-Boado, et al., 1987, Fernandez, et al., 1992, Ordiz, et al., 1995, Ordiz, et al., 1996) und Malatsynthase Mls1p (, et al..) betroffen. Weitere Substrate der Glucoseinaktivierung neben diesen Schlüsselenzymen sind Acs1p (de Jong-Gubbels et al.; 1997), eine der beiden Acetyl-CoA-Synthetasen, und die cytoplasmatische Malatdehydrogenase Mdh2p (Witt, et al., 1966, Ferguson, et al., 1967, Neeff und Heer, 1978, Neeff, et al., 1978, Entian, et al., 1984, Funaguma, et al., 1985, Minard und McAlister-Henn, 1992 und Minard und McAlister-Henn, 1994). Auffällig ist, daß es sich hierbei sämtlich um Zielgene des Transkriptionsfaktors Cat8p (siehe 1.6.2) handelt. Des weiteren unterliegen Aminopeptidase I (Holzer, 1979), die Glucosetransporter Hxt6p und Hxt7p (Rimballo und Lagunas, 1994, Krampe, et al., 1998), der Maltosetransporter Mal61p (Lucero, et al., 1993, Medintz, et al., 1996 und Brondijk et al., 1998, Jiang, et al., 2000) und der Galactosetransporter Gal2p (Matern und Holzer, 1977 und Horak und Wolf, 1997) der Glucoseinaktivierung. Durch diese Inaktivierung der Enzyme wird der unnötige Verbrauch von ATP oder Reduktionsäquivalenten durch den gleichzeitigen Ablauf von z.B. Glycolyse (futile unterbunden. und Gluconeogenese cycle) Diese Inaktivierung ist gluconeogenischen Enzym Fructose-1,6-bis-phosphatase (FBPase, Fbp1p) eingehend untersucht worden (z. B. Gancedo, 1971, Funayama, et al., 1980, Müller und Holzer, 1981, Mazon, et al., 1982 und Entian, et al., 1984). Dabei kommt es zuerst zu einer, noch reversiblen, Phosphorylierung des Enzyms Fbp1p an Serinrest 11 innerhalb der ersten Minuten nach Glucosezugabe, welche die Aktivität des Enzyms um ca. 50% herabsetzt (Müller und Holzer, 1981, Mazon et al., 1982 und Rittenhouse, et al., 1987), gefolgt von einer irreversiblen Proteolyse dieses Enzyms (Holzer und Purwin, 1986). Die Phosphorylierung bedingt dabei nicht die nachfolgende Proteolyse, was durch Mutagenese des Serinrests 11, welche nicht zu einem Ausfall der langsamen durch die Proteolyse bestimmten Inaktivierung

führt, gezeigt werden konnte (Rose, et al., 1988). Ein Einfluß des Proteasoms auf den Abbau von Fbp1p konnte gezeigt werden (Schork, et al., 1994, Schork, et al., 1995, Hämmerle, et al., 1998, Schulte, et al., 2000 und Horak, et al., 2002). Andere Hinweise sprechen hingegen für einen Abbau der FBPase in der Vakuole (Hoffman und Chiang, 1996, Chiang und Chiang, 1998 und Shieh und Chiang, 1998). Andere Zielproteine der Glucoseinaktivierung werden entweder über das Proteasom oder vacuolär, wie etwa Mal61p (Riballo, et al., 1995) oder Gal2p (Horak und Wolf, 1997 und Horak, et al., 2002), abgebaut.

1.3 Glucoseinduzierter gezielter mRNA-Abbau

Um bei der Umstellung auf Wachstum mit Glucose als Kohlenstoffquelle die weitere Synthese nicht mehr benötigter Proteine zu verhindern, wird die mRNA für diese Genprodukte selektiv degradiert. Dieser Mechanismus wurde schon sehr früh für die mRNA des SUC2 Genproduktes postuliert (Elorza, et al., 1977). Ziel dieses glucoseinduzierten Abbaus von mRNA bei Glucosekonzentrationen größer 1% Endkonzentration sind z.B. die Sdh2p, einer Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase, kodierende mRNA (Lombardo, et al., 1992), die mRNA von Suc2p, der Invertase (Cereghino und Scheffler, 1996) und die mRNA des Lactat/Protonen Symporters der Hefe, Jen1p (Andrade und Casal, 2001). Die glucoseinduzierte Degradation der mRNA von Fbp1p, der Fructose-1,6-bis-phosphatase, und Pck1p, der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase, beginnt sogar schon bei Glucosekonzentrationen von weniger als 0,02% (Yin, et al., 2000). Durch Glucosezugabe wird binnen weniger Minuten die mRNA dieser Proteine vollständig abgebaut, dadurch wird die Neusynthese dieser Proteine verhindert.

1.4 Glucoserepression

Bei der Glucoserepression handelt es sich, wie unter 1.1 beschrieben, um einen Mechanismus, der die Transkription bestimmter Gene selektiv bei Anwesenheit der Kohlenstoffquelle Glucose unterbindet. Zur Auslösung der Glucoserepression ist ein funktionsfähiges PII-Isoenzym der Hexokinase, codiert durch *HXK2*, notwendig (Entian, 1980 und Entian und Fröhlich, 1984). Dabei ist anzumerken, daß die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* drei

glucosephosphorylierende Enzyme besitzt, wobei die zwei Hexokinase-Isoenzyme Hxk1p und Hxk2p Glucose und Fructose phosphorylieren, die Glucokinase Glk1p hingegen nur Glucose (Gancedo, et al., 1977, Maitra und Lobo, 1983 und Albig und Entian, 1988). Nur ein Fehlen des PII- Isoenzyms führt zu einem Repressionsausfall bezüglich der Invertase (Ma, et al., 1989) und der Gene der Gluconeogenese, der Atmungskette und des Citratzyklusses, etc. (Entian, et al., 1984). Verlust der anderen glucosephosphorylierenden Enzyme hat auf diese langanhaltende Regulation keinen Einfluß. Die Glucoserepression kann ebenfalls durch Überexpression des PI-Isoenzyms der Hexokinase etabliert werden (Rose, et al., 1991), eine kurzfristige Repression der entsprechenden Gene wird sogar von allen drei Glucose phosphorylierenden Enzymen ausgelöst. (Sanz, et al., 1996 und De Winde, et al., 1996). Dabei scheint ein effizienter Phosphorylgruppen-Transfer der Hexokinase PII eine entscheidende Rolle bei der Etablierung der Glucoserepression zu spielen, während die Zuckerbindung, wie von Hohmann, et al., 1999 vorgeschlagen, alleine keinen Einfluß zu haben scheint (Kraakman, et al.; 1999). Die Aktivität der Hexokinase selbst, das bedeutet, die Konzentration an Glucose-6-Phosphat in den Zellen, scheint hingegen nicht, wie lange angenommen (Ma, et al., 1989 und Rose, et al., 1991), zur Etablierung der Glucoserepression beizutragen (Hohmann, et al., 1999 und Kraakman, et al., 1999). Die Aktivität der Glucosephosphorylierung scheint auch einen Einfluß auf die Entstehung eines transienten cAMP-peaks nach Glucosezugabe zu haben (Thevelein und Beullens, 1985). Dabei sind Auswirkungen auf den c-AMP-Spiegel und die Auslösung der Glucoserepression klar voneinander zu trennen (Hohmann, et al., 1999 und Kraakman, et al., 1999). Auch Fructose kann transient zur Repression führen, wobei hier auch eine Abhängigkeit von Hxklp zu beobachten ist (De Winde, et al., 1996). Eine längeranhaltende Repression durch Fructose ist hingegen nicht zu beobachten, da HXK1, und auch GLK1, selbst der Glucoserepression durch Hxk2p unterliegen (Herrero, et al., 1995, De Winde, et al., 1996 und Rodriguez, et al., 2001). Eine weitere Komponente der Glucoserepression, Glc7p, gehört zu den Typ 1 Phosphatasen (Feng, et al., 1991 und Stark, 1996). Diese Phosphatasen bestehen aus einer katalytischen Untereinheit, Glc7p, auch Cid1p genannt (Zimmermann und Scheel, 1977), und jeweils einer von mehreren regulatorischen Untereinheiten. Die Deletion der katalytischen Untereinheit ist letal für die Zellen (Feng, et al., 1991, Wek, et al., 1992, Cannon, et al., 1994, Vincent, et al., 1994 und Sakumoto, et al., 1999), während die Deletion einer der regulatorischen Untereinheiten den Ausfall bestimmter Funktionen zur Folge hat. Die regulatorischen Untereinheiten bestimmen den durch die Phosphataseaktivität der katalytischen Untereinheit zu beeinflussenden Weg. So interagiert Glc7p etwa mit Gac1p im Zuge der Glycogen-Akkumulation (Ramaswamy, et al., 1998); mit Glc8p im Zusammenhang mit Vacuolen-Fusion (Peters, et al., 1999) und Glycogen-Akkumulation (Cannon, et al., 1994); mit Gip1p bei Sporulationsprozessen (Ramaswamy, et al., 1998). Weitere regulatorische Untereinheiten sind Gip2p, dem evtl. ein Einfluß auf die Meiose zugeschrieben wird (Schwikowski, et al., 2000); Reg2p (Frederick und Tatchell, 1996), das wohl zusammen mit Reg1p an der Glucoseinaktivierung des Mal61 Proteins beteiligt ist (Jiang, et al., 2000); sowie Reg1p allgemein in der Glucoserepression (Tu und Carlson, 1995). Eine Funktion von Reg1p, auch Hex2p genannt (Zimmermann und Scheel, 1977), in der Glucoserepression zeigte sich im Repressionsausfall des Invertasegens SUC2, des Gen der Maltase und einiger Gene von mitochondrialen Enzymen (Niederacher und Entian, 1987 und Niederacher und Entian, 1991). Die Deregulation der für die Verwertung von Maltose notwendigen Gene in einer reg1 Mutante führt zur sogenannten Maltosehemmung (Entian, 1980), einer Unfähigkeit, auf dieser Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dies geht mit einer 60-fach erhöhten intrazellulären Gluosekonzentration einher, welche auch Einfluß auf die Proteinbiosynthese zu haben scheint (Entian, 1980 und Entian und Loureiro-Dias, 1990). In einer reg1 Mutante ist außerdem die Aktivität des Hexokinase PII Isoenzyms zwei- bis dreifach erhöht, was auf eine gesteigerte Synthese dieses Enzyms zurückzuführen ist (Entian, 1980). Der Phosphatase-Komplex Glc7/Reg1p scheint das Hexokinase PII Isoenzym außerdem zu dephosphorylieren (Alms et al., 1999). Diese Dephosphorylierung hat einen Einfluß auf das Monomer-Dimer Gleichgewicht dieses Enzyms, wobei nur das Monomer phosphoryliert vorliegt. Diese monomere Form überwiegt bei Wachstum auf schlechten Kohlenstoffquellen, Galactose und Raffinose eingeschlossen, während die Dephosphorylierung und damit Dimerisierung durch Glucosezugabe stimuliert wird. Dies deutet auf einen direkten Zusammenhang dieser Phosphorylierung/ Dephosphorylierung auf die Auslösung des Glucoserepressions-Signals hin (Randez-Gil, et al., 1998). Gestützt wird diese Annahme durch den Befund, daß durch Veränderungen im Reg1p Phosphatase-1C-Bindestellen Motiv Hxk2p vermehrt in der phosphorylierten Form vorliegt (Alms, et al., 1999). Eine Überexpression von Reg1p kann außerdem den Deletionsphänotyp einer hxk2 Deletion im Bezug auf die Repression des SUC2 Genes (Invertase) supprimieren (Niederacher und Entian, 1991 und Sanz, et al., 2000^a). Interessanterweise führt eine Deletion der regulatorischen Untereinheit REG1 auch zu einer erhöhten Stabilität der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase kodierenden mRNA (PCK1) bei Glucosekonzentrationen kleiner 0,02% (Yin, et al., 2000), die der glucoseinduzierten mRNA Degradation unterliegt (siehe 1.3).