

Molekularer Mechanismus eines Transkriptionsschalters:  
Experimentelle Analyse und mathematische Modellierung des  
Gal4-Gal80-Gal1-Regulationsmoduls aus *Kluyveromyces lactis*

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Alexander Anders  
geb. am 07.03.1977 in Moskau

Gutachter: 1. Prof. Dr. Karin Breunig  
2. Prof. Dr. Elmar Wahle  
3. Prof. Dr. Karsten Melcher

Tag der öffentlichen Veteidigung: 10.05.2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000010524**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010524>]



## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite	
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Überblick über die Transkriptionsaktivierung in Eukaryonten	1
1.2.	Das <i>GAL</i> -Regulon – ein Modellsystem eukaryotischer Genregulation	6
1.3.	Der Transkriptionsaktivator Gal4	7
1.4.	Inhibierung der Aktivität von Gal4 durch Gal80	8
1.5.	Aufhebung der Inhibierung	10
1.6.	Gegenstand der Arbeit	12
2.	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1.	<i>Kluyveromyces lactis</i> Stämme	14
2.2.	<i>Escherichia coli</i> Stämme	14
2.3.	Medien für die Anzucht	14
2.4.	Plasmide	15
2.5.	Oligonukleotide	17
2.6.	Synthetisches Peptid ( <i>K</i> Gal4-AD)	17
2.7.	PCR-Reaktionen und enzymatische Modifikationen von DNA	18
2.8.	Präparation von <i>K. lactis</i> Zellen für Fluoreszenz-Mikroskopie	18
2.9.	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>K. lactis</i>	18
2.9.1.	Extraktion nativer Proteine mittels Glasperlensaufschluss	18
2.9.2.	Aufschluss von <i>K. lactis</i> Zellen durch SDS-Lysispuffer	19
2.10.	Bestimmung der Proteinkonzentration	19
2.11.	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	19
2.12.	Immunologischer Nachweis der 6xHis-markierten Proteine	20
2.13.	Expression und Reinigung von Proteinen	20
2.13.1.	Expression und Reinigung von <i>K</i> Gal80	20
2.13.2.	Expression und Reinigung von <i>K</i> Gal1	21
2.13.2.1.	Expression und Reinigung von GstGal1	21
2.13.2.2.	Expression und Reinigung von NHGal1	21
2.13.3.	Expression und Reinigung von miniScGal4	22
2.14.	Messung von Enzymaktivitäten	22
2.14.1.	Messung von $\beta$ -Galaktosidase- und $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität mit Proteinextrakt	22

---

2.14.2.	Messung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Flüssig-Zellkulturen von <i>K. lactis</i>	22
2.14.3.	Messung der Galaktokinase-Aktivität von gereinigtem <i>K/Gal1</i> und Durchführung der Galaktokinase Inhibierungsexperimente	23
2.14.4.	Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität im Zellextrakt	24
2.15.	Mathematische Methoden	25
2.15.1.	Durchführung von Simulationen mit den mathematischen Gleichgewichtsmodellen	25
2.15.2.	Parameterschätzung (Ermittlung der Interaktionsparameter)	25
2.15.3.	Berechnung der <i>K/Gal1</i> und <i>K/Gal80</i> Mengen innerhalb einer Zelle	26
2.16.	Analytische Gelfiltration	27
2.17.	Analytische Ultrazentrifugation	27
3.	ERGEBNISSE	28
3.1.	Reinigung der Proteine <i>K/Gal80</i> und <i>K/Gal1</i>	28
3.1.1.	Optimierung der Expression und Reinigung des <i>K/Gal80</i> -Proteins	28
3.1.2.	Expression und Reinigung des <i>K/Gal1</i> -Proteins	30
3.2.	Bestimmung der Interaktionsparameter zwischen den Regulatoren	30
3.2.1.	Die Bindung zwischen <i>K/Gal1</i> und <i>K/Gal80</i> führt zur Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität von <i>K/Gal1</i>	30
3.2.2.	Die beiden verwendeten <i>K/Gal80</i> -Varianten besitzen unterschiedliche Affinitäten zu <i>K/Gal1</i>	32
3.2.3.	Die Aktivierungsdomäne von <i>K/Gal4</i> kompetiert gegen die Inhibierung	34
3.2.4.	<i>miniScGal4</i> hebt die Inhibierung vollständig auf	36
3.2.5.	Die Ergebnisse der Inhibierungs-Experimente sind vollständig kompatibel mit einem reinen Dissoziationsmodell	39
3.3.	Multimerisierung von <i>K/Gal80</i> und Zusammensetzung des Komplexes aus <i>K/Gal80</i> und <i>K/Gal1</i>	42
3.3.1.	Citrat und EDTA stabilisieren eine dimere Form von <i>K/Gal80</i>	43
3.3.2.	Kompetition gegen den Effekt von EDTA	47
3.3.3.	Komposition und Stöchiometrie des <i>K/Gal1-K/Gal80</i> -Komplexes	48
3.3.4.	<i>K/Gal80-S2</i> zeigt ein vom Wildtypprotein verschiedenes Elutionsprofil	52
3.3.5.	Einfluss der Multimerisierung von <i>K/Gal80</i> auf die Bindung an <i>K/Gal1</i>	53
3.4.	Einfluss von Veränderungen an <i>K/Gal80</i> auf die Induktion <i>in vivo</i>	56
3.4.1.	Die Expression der <i>K/Gal80</i> -Variante mit verringerter Affinität zu <i>K/Gal1</i> in <i>K. lactis</i> führt zum vollständigen Ausfall der Galaktose-Induktion	57

3.4.2.	Die Verdoppelung der Gendosis von <i>KIGAL80</i> führt zur Nichtinduzierbarkeit des <i>GAL</i> -Regulons	59
3.5.	Die Interaktion zwischen <i>KIGal1</i> und <i>KIGal80</i> erfolgt im Zellkern	60
3.6.	Ermittlung der intrazellulären Mengen an <i>KIGal1</i> und <i>KIGal80</i>	61
3.7.	Der Galaktose-Schalter aus mathematischer Sicht	64
3.7.1.	Grundlegende Modellannahmen	65
3.7.2.	Vorgehen bei der Simulation und Definitionen	67
3.7.3.	Modell Nummer 1: Das naive Modell	69
3.7.4.	Modell Nummer 2: Ein komplexeres Interaktionsmodell	73
3.7.5.	Kopplung der Regulatoren Gal1 und Gal80	77
3.7.6.	Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 im nicht-induzierten Zustand	79
3.8.	Beeinflussung der Galaktose-Induktion durch Promotorvariante und <i>KIGal4</i> -Menge	84
4.	DISKUSSION	88
4.1.	Die intrazelluläre Lokalisation der Regulatoren	88
4.2.	Der molekulare Mechanismus des Galaktose-Schalters und Implikationen für seine mathematische Modellierung	90
4.3.	Die Multimerisierung von <i>KIGal80</i> und der Einfluss von Citrat und EDTA	95
4.4.	Der Modus der Interaktion zwischen <i>KIGal1</i> und <i>KIGal80</i>	98
4.5.	Kompetition der <i>KIGal80</i> -Multimerisierung gegen die Bindung von <i>KIGal1</i>	101
4.6.	Annahmen in den Simulationen	103
4.7.	Überlegungen zur Logik des Galaktose-Schalters oder: Warum wird <i>GAL80</i> autoreguliert?	105
4.8.	Modellvorstellung zur Galaktose-Induktion in <i>K. lactis</i>	107
5.	ZUSAMMENFASSUNG	109
6.	LITERATURVERZEICHNIS	111
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	123



## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Überblick über die Transkriptionsaktivierung in Eukaryonten

Eine der kennzeichnenden Eigenschaften lebender Organismen ist die Fähigkeit zur Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen wie Temperatur oder Nährstoffangebot. Lebende Zellen, die kleinsten Einheiten von Leben, sind in der Lage, ein relativ konstantes inneres Milieu trotz sich ändernder äußerer Bedingungen aufrecht zu erhalten. Dieses Phänomen wird als Homöostase bezeichnet und verlangt sowohl die Wahrnehmung bestimmter Faktoren der äußeren Umgebung als auch die Fähigkeit zur Regulation der inneren (zellulären) Prozesse.

Eine zentrale Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse spielt die Kontrolle der Genexpression, also die Umwandlung von (genetischer) Information in biologisch wirksame Moleküle wie RNA's, Enzyme oder strukturelle Proteine. Die Expression der genetischen Information erfolgt über eine Reihe von Schritten und kann demzufolge an vielen Stellen kontrolliert und reguliert werden. Einen wichtigen und, zumindest in Mikroorganismen, dominanten Mechanismus stellt die Steuerung der Transkription, insbesondere ihrer Initiation, dar.

Ein großer Teil des heutigen Wissens über die Genexpression und ihre Regulation in Eukaryonten beruht auf Untersuchungen an der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Analyse verschiedener Promotoren führte zur Identifizierung mehrerer funktioneller Elemente, welche zur Transkription eines Gens benötigt werden (Reviews: Guarente, 1988; Struhl, 1989; Lee und Young, 2000). Der Core-Promotor eines typischen eukaryotischen Proteincodierenden Gens enthält die Transkriptions-Initiationsstelle und die TATA-Box, eine AT-reiche Sequenz, welche als Bindestelle für TBP (TATA Bindeprotein), einer Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID, dient. In einigen Promotoren enthält die Transkriptions-Initiationsstelle, welche den Start der Transkription markiert, ein sogenanntes Initiator-Element, das verschiedene regulatorische Faktoren binden kann (Lee und Young, 2000). Der Core-Promotor ist ausreichend zur Einleitung der Transkription eines „nackten“ (nicht in Chromatin verpackten) DNA-Stranges durch die basale Transkriptionsmaschinerie *in vitro*. Diese besteht aus der Core-Polymerase II und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren. Die Core-Polymerase II (Pol II) aus Bäckerhefe und Mensch besteht aus 12 Untereinheiten; die größte Untereinheit enthält die C-terminale Domäne (CTD), welche aus Tandem-Wiederholungen einer Heptapeptid-Sequenz besteht. Modifikationen der CTD durch Phosphorylierungen spielen unter anderem eine wichtige Rolle beim Übergang der Transkription von der Initiation zur Elongation. Die Pol II enthält sämtliche enzymatischen

Funktionen, welche zur Transkription eines nackten DNA-Stranges *in vitro* notwendig sind, benötigt zur spezifischen Transkriptionsinitiation allerdings weitere Faktoren, die allgemeinen Transkriptionsfaktoren. Diese Klasse von Proteinen umfasst die Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH, welche jeweils (bis auf TFIIB) Multiproteinkomplexe darstellen (Lee und Young, 2000).

In eukaryotischen Zellen ist die DNA in Nukleo-Protein-Komplexe, das Chromatin, verpackt. Die basale Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein Komplex, in welchem die DNA ein Oktamer von Histon-Molekülen umwindet. Eine Konsequenz der Verpackung eukaryotischer DNA ist, dass die Zugänglichkeit der Transkriptionsmaschinerie zu den Promotoren beeinträchtigt ist. Initiation und Elongation der Transkription *in vivo* sind komplexer im Vergleich zur Situation *in vitro* und benötigen weitere, unter anderem Chromatin-modifizierende, Faktoren.

In den meisten Fällen wird zur Transkription eines Protein-codierenden Gens *in vivo* die Aktivität eines Transkriptionsaktivators benötigt. Natürliche Promotoren enthalten neben den Elementen eines Core-Promotors in der Regel Sequenzen (sogenannte Enhancer oder UAS-Elemente), welche durch Transkriptionsaktivatoren gebunden werden können. Deletionen dieser Sequenzen führen gewöhnlich zum Verlust der Transkription des entsprechenden Gens.

Eukaryotische Transkriptionsaktivatoren sind typischerweise modular aufgebaut und enthalten mindestens zwei Domänen: die DNA-Bindedomäne (DBD), durch welche der Aktivator sequenzspezifisch an die Enhancer- oder UAS-Elemente binden kann, und die Aktivierungsdomäne (AD), welche für die Aktivierung der Transkription eines Gens verantwortlich zeichnet.

Mit Hilfe der AD können DNA-gebundene Aktivatoren (direkt und/oder indirekt) die Transkriptionsmaschinerie rekrutieren (für Reviews zum Rekrutierungsmodell s. z.B. Ptashne und Gann, 1997; Lee und Young, 2000; Green, 2005) und somit die Assemblierung eines Präinitiationskomplexes (PIC) am Promotor eines Gens unterstützen. Dieser Komplex enthält neben der basalen Transkriptionsmaschinerie weitere Multiprotein-Komplexe wie zum Beispiel den Mediator oder den SAGA-Komplex. Einige dieser Komplexe bzw. deren Komponenten sind essentiell für die Funktion bestimmter Aktivatoren und werden in Folge dessen als deren Co-Aktivatoren bezeichnet. Die Formation des PIC am Promotor eines Gens kann durch direkte Interaktion einer oder mehrerer seiner Komponenten mit der AD und/oder durch eine Aktivator-vermittelte Modifikation der Chromatinstruktur (z.B. durch Rekrutierung Chromatin-modifizierender Komplexe) unterstützt werden. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivator-abhängige Rekrutierung des SAGA-Komplexes, welcher Histon-Acetyltransferase- (HAT) Aktivität besitzt, sowohl HAT-abhängig (Kuo *et al.*, 1998; Vignali *et al.*, 2000) als auch -unabhängig (Bhaumik und Green, 2001; Review in Green, 2005) die Transkription stimulier

ren kann. Im Falle des *HO* Gens aus *S. cerevisiae* rekrutiert der Aktivator Swi5 den Chromatin-remodellierenden Komplex Swi/Snf und den SAGA-Komplex vor der Bindung eines zweiten Aktivators (SBF), welcher seinerseits die Assemblierung des Präinitiationskomplexes am Promotor unterstützt (Cosma *et al.*, 1999).

*In vitro* können unterschiedliche Aktivierungsdomänen jeweils mit einer Reihe verschiedener Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und mit Chromatin-modifizierenden Faktoren interagieren (s. z.B. Barberis und Petraschek, 2003 und dortige Referenzen). Sofern quantifiziert, erfolgen die einzelnen Interaktionen mit relativ niedriger Affinität und Spezifität (Melcher, 2000, Wu *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Gene bezüglich ihrer aktivierten Transkription unterschiedlich auf Mutationen oder Deletionen einzelner Komponenten der Transkriptionsmaschinerie reagieren und dass diese Unterschiede nicht durch den jeweiligen Transkriptionsaktivator selbst, sondern durch den Promotor determiniert werden (Gaudreau *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Aktivatoren *in vivo* potentiell verschiedene Proteine zur Rekrutierung des Transkriptionsapparates binden können und dass das von der AD in einem bestimmten Fall kontaktierte Zielprotein (bzw. die Zielproteine) unter anderem vom Kontext des durch den Aktivator gebundenen Promotors bestimmt wird. Inwiefern die Interaktionen von AD's mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie von physiologischer Relevanz bzw. die Rekrutierungen bestimmter Faktoren an die Promotoren essentiell sind, scheint unter anderem auch vom aktuellen Zustand der Zelle bzw. des Chromatins abzuhängen. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Aktivität des Chromatin-remodellierenden Swi/Snf-Komplexes für die Aktivierung des *GAL1*-Gens lediglich während der Mitose erforderlich ist; die Aktivierung dieses Gens in Interphase-Zellen hingegen kann unabhängig von Swi/Snf erfolgen (Krebs *et al.*, 2000).

In neueren Arbeiten konnten einige Proteine identifiziert werden, welche von den Aktivatoren Gal4 und Gcn4 im Zuge der Transkriptionsaktivierung *in vivo* direkt gebunden werden (Bhaumik *et al.*, 2004; Fishburn *et al.*, 2005, Reeves und Hahn, 2005). Eines dieser Proteine, welches in sämtlichen Arbeiten als essentielles Zielprotein identifiziert wurde, ist Tra1, eine Untereinheit des SAGA-Komplexes.

Neben der Unterstützung der Assemblierung eines Präinitiationskomplexes können Aktivatoren Schritte der Transkription beeinflussen, welche diesem Prozess nachgelagert sind. So wurde berichtet, dass Aktivatoren die Elongationsrate der Polymerase beeinflussen (Yankulov *et al.*, 1994) und mehrere Zyklen der Transkription durch Unterstützung einer Reinitiation stimulieren können (Yudkovsky *et al.*, 2000; Zawel *et al.*, 1995).

Gerade in jüngerer Zeit konnte in einer Reihe von Arbeiten gezeigt werden, dass eine positive Korrelation besteht zwischen der Ubiquitinierung (und Ubiquitin-abhängigen Degradation) von Aktivatoren und ihrer Fähigkeit zur Stimulierung der Genexpression (Reviews in Lipford und Deshaies, 2003; Muratani und Tansey, 2003; Herrera und Triezenberg, 2004). Interes-

santerweise überlappt die Aktivierungsdomäne vieler Aktivatoren mit Sequenzen, welche Ubiquitinierungssignale darstellen (Salghetti *et al.*, 2000) und häufig korreliert die Effizienz der Proteasomen-vermittelten Degradation von Aktivatoren mit ihrer Potenz zur Genaktivierung (Lipford *et al.*, 2005; Molinari *et al.*, 1999). Einige neuere Arbeiten legen den Schluss nahe, dass die Ubiquitinierung von Aktivatoren mit Prozessen im Zusammenhang steht, welche der Assemblierung des PIC am Promotor nachgelagert sind; es wurde vorgeschlagen, dass diese Modifikation die Effizienz der Elongation (bzw. des Überganges von der Initiation zur Elongation) und/oder die ordnungsgemäße co-transkriptionelle Reifung der mRNA beeinflusst (Kurosu und Peterlin, 2004; Muratani *et al.*, 2005). Einige Arbeiten stützen die Sicht, dass die Ubiquitinierung von Aktivatoren per se (und nicht die Ubiquitin-abhängige Proteolyse) notwendig ist für die Stimulation der Genexpression (Kurosu und Peterlin, 2004; Salghetti *et al.*, 2001). Die Ergebnisse von Kurosu und Peterlin (2004) deuten darauf hin, dass diese Modifikation die Rekrutierung von Faktoren unterstützt, welche die Effizienz der Transkriptions-Elongation positiv beeinflussen. In einer neueren Arbeit wurde gezeigt, dass die Ubiquitinierung des Aktivators Gcn4 nicht ausreichte für die maximale Aktivierung seiner Zielgene, sondern zu diesem Zweck seine Ubiquitin-abhängige Degradation notwendig war (Lipford *et al.*, 2005). Es könnte somit sein, dass die Stimulation der Aktivität von Transkriptionsaktivatoren durch das Ubiquitin-Proteasomen-System sowohl proteolytische als auch nicht-proteolytische Mechanismen beinhaltet.

Viel von dem Wissen über die Mechanismen der Transkriptionsaktivierung beruht auf Untersuchungen des Aktivators Gal4 aus *S. cerevisiae* (ScGal4) und der Aktivierung seiner Zielgene, der *GAL/MEL*-Gene, welche unter anderem für die Verwertung des Zuckers Galaktose benötigt werden. An dieser Stelle soll ein kurzer Überblick über die Mechanismen der Transkriptionsaktivierung durch ScGal4 in *S. cerevisiae* gegeben werden.

Wie bereits erwähnt, besitzen die Aktivierungsdomänen von Transkriptionsaktivatoren in der Regel die Fähigkeit, *in vitro* mit einer Vielzahl von Proteinen des Transkriptionsapparates (relativ unspezifisch) interagieren zu können. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die AD von ScGal4 *in vitro* mit verschiedenen Komponenten der Transkriptionsmaschinerie interagieren kann, inklusive TBP (Melcher und Johnston, 1995; Wu *et al.*, 1996), TFIIB (Wu *et al.*, 1996), Srb4 (Koh *et al.*, 1998), Gal11 (Jeong *et al.*, 2001), Sug1 (Melcher und Johnston, 1995) und Tra1 (Brown *et al.*, 2001). Durch neuere Arbeiten konnte relativ detailliert aufgeschlüsselt werden, welche Ereignisse der Aktivierung der *GAL*-Gene zu Grunde liegen; insbesondere wurde hierbei der divergente *GAL1-GAL10*-Promotor, welcher vier Bindestellen für Gal4 enthält, intensiv untersucht. Die Ergebnisse von CoIP-Experimenten legen den Schluss nahe, dass an diesen Promotor im Zuge der Galaktose-Induktion zeitlich aufeinanderfolgend die Komplexe SAGA, Mediator und Pol II (inklusive TBP und weiterer GTF's)

rekrutiert werden (Bhaumik *et al.*, 2004; Bryant und Ptashne, 2003). Die Rekrutierung des SAGA-Komplexes erfolgt wahrscheinlich durch direkte Interaktion seiner Untereinheit Tra1 mit der Gal4-AD (Bhaumik *et al.*, 2004; Reeves und Hahn, 2005). Es ist nicht vollständig klar, ob die Rekrutierung des Mediators von der zuvor erfolgten Rekrutierung des SAGA-Komplexes abhängt (Bhaumik *et al.*, 2004) oder SAGA-unabhängig erfolgen kann (Bryant und Ptashne, 2003). Die zweite Möglichkeit steht in Übereinstimmung mit dem Befund, dass Gal11 (eine Untereinheit des Mediators) während der Galaktose-Induktion direkt mit der Gal4-AD interagiert; allerdings scheint diese Interaktion für die Aktivierung der *GAL*-Gene von untergeordneter Bedeutung zu sein (Reeves und Hahn, 2005). In jedem Fall scheint die Rekrutierung des SAGA-Komplexes an den *GAL1-GAL10*-Promotor essentiell zu sein für die nachgelagerte Rekrutierung der Pol II und die Transkription der entsprechenden Gene (Bhaumik *et al.*, 2004; Bryant und Ptashne, 2003).

Im Zuge der Genaktivierung erfolgt neben der Assemblierung des PIC die Rekrutierung des nicht-proteolytischen 19S-Subkomplexes des Proteasoms an den *GAL1-GAL10*-Promotor (Gonzalez *et al.*, 2002). Dieser Komplex spielt offenbar eine wichtige (nicht-proteolytische) Rolle für eine effiziente Transkriptions-Elongation (Ferdous *et al.*, 2001). Eine Untereinheit dieses Komplexes, Sug1, wurde als Co-Aktivatoren von Gal4 für die Aktivierung der *GAL*-Gene beschrieben (Swaffield *et al.*, 1992; Gonzalez *et al.*, 2002). Möglicherweise kann der 19S-Komplex direkt von Gal4 rekrutiert werden (Gonzalez *et al.*, 2002) und es könnte sein, dass hierfür die Ubiquitinierung des Aktivators eine wichtige Rolle spielt. In einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gal4 zwei verschiedene Modi der Ubiquitinierung (und Ubiquitin-vermittelten Proteolyse) durchlaufen kann (Muratani *et al.*, 2005). Einer dieser Modi ist abhängig vom F-Box Protein Dsg1 und essentiell für die effektive Aktivierung der *GAL*-Gene. In Abwesenheit von Dsg1 ist transkriptionell aktives Gal4 stabil, nicht ubiquitiniert und unfähig zur effizienten Stimulation der Genexpression. Interessanterweise konnten die Autoren zeigen, dass die Deletion von *DSG1* nicht zu einer verminderten Transkription der *GAL*-Gene führt; die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die transkribierte RNA in diesem Fall nicht translatiert wird. Die Autoren schlagen ein Modell vor, nach welchem die Ubiquitin-abhängige Degradation von DNA-gebundenem und in die Transkription involviertem Gal4 notwendig ist für die Transition des PIC in einen voll funktionstüchtigen elongierenden Komplex, welcher zur ordnungsgemäßen co-transkriptionellen Prozessierung der RNA befähigt ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Ubiquitinierung per se in diesem Fall entscheidend ist (z.B. zur Unterstützung der Rekrutierung des 19S-Komplexes).

Auch Veränderungen der Chromatin-Struktur spielen bei der Aktivierung der *GAL*-Gene offensichtlich eine Rolle. Im Zuge der Genaktivierung durchläuft der *GAL1-GAL10*-Promotor eine Umgestaltung des Chromatins, wobei ein Nuklease-sensitiver Bereich vergrößert wird (Cavalli und Thoma, 1993).

## 1.2. Das GAL-Regulon – ein Modellsystem eukaryotischer Genregulation

Die Regulation des Transkriptionsaktivators ScGal4 und damit seiner Zielgene in Abhängigkeit der vorhandenen Kohlenstoffquellen ist in der Vergangenheit intensiv untersucht worden. Der Fokus der hier vorliegenden Arbeit liegt auf dem mechanistisch sehr ähnlichen System zur Regulation der Aktivität des KGal4-Proteins in der Hefe *Kluyveromyces lactis*. In beiden Hefen ist das Gal4-Protein der Aktivator des GAL-Regulons. Dieses umfasst eine Gruppe von Genen (die LAC/GAL-Gene in *K. lactis* bzw. die GAL/MEL-Gene in *S. cerevisiae*), welche für enzymatische und regulatorische Proteine codieren, die am Transport und der Verwertung des Zuckers Galaktose und Galaktose-haltiger Disaccharide beteiligt sind. Die Regulation des GAL-Regulons stellt ein Paradigma für eukaryotische Genregulation dar.

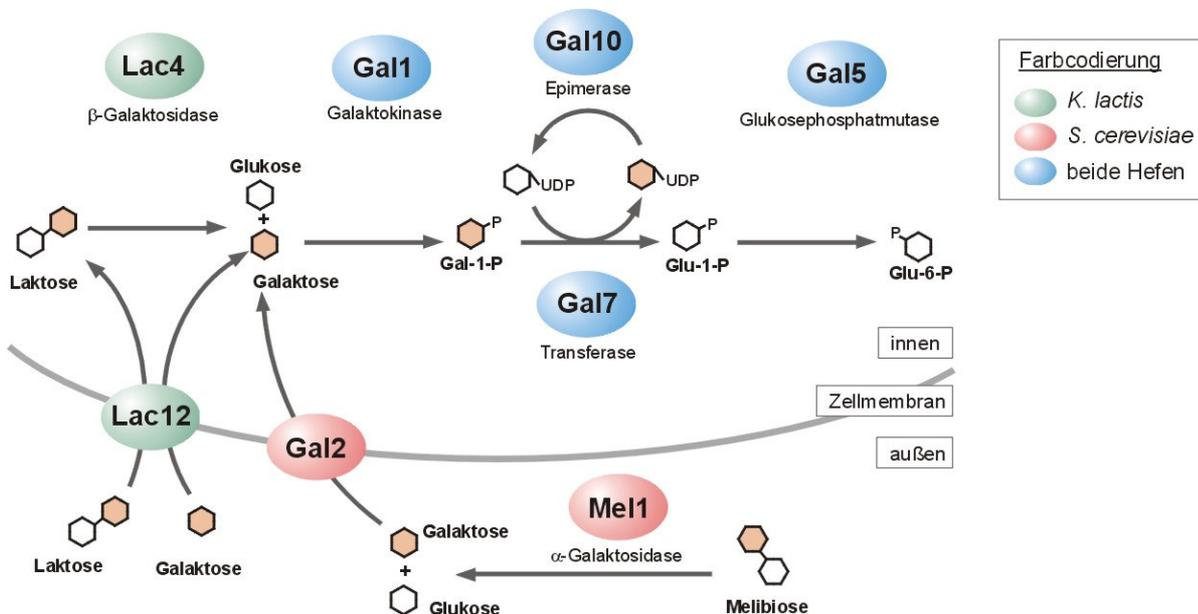


Abbildung 1. Übersicht über den Galaktose-Metabolismus in *K. lactis* und *S. cerevisiae*. Die Enzyme des „Leloir-Stoffwechselweges“ sind Gal1, Gal7 und Gal10.

Abbildung 1 zeigt einen Überblick über den Galaktose-Metabolismus der beiden Hefen. Die Einschleusung von Galaktose in die Zelle erfolgt durch den Transporter Lac12 in *K. lactis* bzw. Gal2 in *S. cerevisiae* (Review in Boles und Hollenberg, 1997). Durch die sequentielle Einwirkung verschiedener Enzyme wird intrazelluläre Galaktose in Glukose-6-Phosphat umgewandelt („Leloir-Stoffwechselweg“, s. Abb. 1), welches in die Glykolyse eintreten kann. Der Transporter Lac12 aus *K. lactis* kann neben Galaktose auch das Disaccharid Laktose ( $\beta$ -1,4-Gal-Glc) in die Zelle transportieren, welches durch enzymatische Einwirkung der  $\beta$ -Galaktosi-

dase Lac4 zu den Monosacchariden Galaktose und Glukose umgesetzt wird. *S. cerevisiae* kann im Gegensatz zu *K. lactis* keine Laktose verwerten; sie ist hingegen in der Lage, das Disaccharid Melibiose ( $\alpha$ -1,4-Gal-Glc) mit Hilfe einer vom *MEL1*-Gen codierten  $\alpha$ -Galaktosidase zu hydrolysieren.

Die *LAC/GAL*- bzw. *MEL/GAL*-Gene der beiden Hefen (im Folgenden einheitlich als *GAL*-Gene bezeichnet) werden in Abhängigkeit der Kohlenstoffquellen Glukose und Galaktose auf der Ebene der Transkription reguliert. Prinzipiell können drei Expressionszustände unterschieden werden. Bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren C-Quellen (Glyzerin, Laktat, Ethanol) ist eine geringe oder keine Expression nachweisbar (nicht-induzierter bzw. dereprimierter Zustand), die Anwesenheit von Galaktose (oder Laktose bzw. Melibiose) führt zur Induktion der Gene (induzierter Zustand). Die Galaktose-abhängige Induktion wird in *S. cerevisiae* in Anwesenheit von Glukose fast vollständig reprimiert (reprimierter Zustand). Dieser als Glukose-Repression bezeichnete Mechanismus betrifft neben den *GAL*-Genen eine Reihe weiterer Gene und ist somit der Regulation durch Galaktose hierarchisch übergeordnet. Prinzipiell ist die Glukose-Repression in *S. cerevisiae* sehr stark ausgeprägt. Bei *K. lactis* gibt es sowohl Stämme mit starker Glukose-Repression als auch solche, bei denen die Induktion der *GAL*-Gene kaum oder gar nicht von Glukose beeinflusst wird (Breunig, 1989); das Ausmaß der Reprimierbarkeit wird hauptsächlich durch die Konzentration des Transkriptionsaktivators Gal4 determiniert (Zachariae *et al.*, 1993).

Die grundlegenden Mechanismen, durch welche die Aktivität der *GAL*-Gene in Abhängigkeit von Galaktose reguliert wird, sind zwischen den beiden Hefen *S. cerevisiae* und *K. lactis* stark konserviert. In beiden Hefen wirkt das Galaktose-Signal über einen Schalter (Galaktose-Schalter), welcher neben dem Aktivator Gal4 aus den Komponenten Gal80 und Gal1 (bzw. primär Gal3 in *S. cerevisiae*) besteht.

### 1.3. Der Transkriptionsaktivator Gal4

Der Transkriptionsaktivator Gal4 aus *S. cerevisiae* ist in einer Vielzahl eukaryotischer Organismen zur Stimulation der Genexpression befähigt (Kakidani und Ptashne, 1988; Ma *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1988). Auf Mechanismen der Transkriptionsaktivierung durch Gal4 wurde bereits weiter oben eingegangen.

Die beiden homologen Gal4-Proteine aus *S. cerevisiae* (ScGal4) und *K. lactis* (KlGal4) können die *GAL*-Gene der jeweils anderen Hefe aktivieren (Riley *et al.*, 1987; Salmeron und

Johnston, 1986) und zeigen einen für eukaryotische Aktivatoren typischen modularen Aufbau. Im N-terminalen Bereich von Gal4 befinden sich Determinanten für den Transport in den Zellkern (Silver *et al.*, 1984), die Dimerisierungsdomäne (Carey *et al.*, 1989; Marmorstein *et al.*, 1992) und die DNA-Bindedomäne (DBD), mit deren Hilfe das Protein in dimerer Form an die palindromische Sequenz der UAS-Elemente [Konsensussequenz: CGGN<sub>5</sub>(A/T)N<sub>5</sub>CCG] stromaufwärts der *GAL*-Gene bindet (Carey *et al.*, 1989; Halvorsen *et al.*, 1990). Innerhalb der DBD befinden sich sechs Cysteinreste, welche durch koordinative Bindung von zwei Zink-Ionen einen Cystein-Zink-Cluster, ein zur DNA-Bindung verwendetes Strukturmotiv, bilden (Pan *et al.*, 1990).

Die Aktivierungsdomäne (AD) von Gal4 (sowohl ScGal4 als auch K/Gal4) befindet sich im C-terminalen Bereich. Sie zeichnet sich durch einen hohen Gehalt saurer Aminosäurereste aus. Auf Grund dieser Eigenschaft wird Gal4 zur Klasse der so genannten „sauren Aktivatoren“ gezählt; zusammen mit dem Protein VP16 aus *Herpes simplex* bildet es den Prototypen dieser Gruppe von Aktivatoren. Durch Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, dass auch ein interner Bereich von ScGal4 die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung besitzt (Ma und Ptashne, 1987a). Die biologische Relevanz dieser „Aktivierungsdomäne“ ist allerdings fraglich, da sie lediglich aktivieren kann, sofern die C-terminale Hälfte von ScGal4 deletiert wird. Ferner können verschiedene ScGal4-Varianten (miniScGal4's), in welchen der interne Bereich vollständig fehlt, ähnlich kompetent aktivieren und ähnlich reguliert werden wie das Wildtypprotein (Ding und Johnston, 1997; Wu *et al.*, 1996). Im Zuge der Induktion der *GAL*-Gene wird ScGal4 phosphoryliert (Sadowski *et al.*, 1991); diese Modifikation ist allerdings keine Voraussetzung der Transkriptionsaktivierung, sondern ihre Folge (Muratani *et al.*, 2005; Sadowski *et al.*, 1991). Möglicherweise dient die Phosphorylierung von ScGal4 der Feinabstimmung der Induktion und/oder der Integration anderer Signale als der Verfügbarkeit von Galaktose (Review dazu in Breunig, 2000). Bislang gibt es keine Hinweise auf eine Phosphorylierung des Gal4-Proteins aus *K. lactis*.

#### 1.4. Inhibierung der Aktivität von Gal4 durch Gal80

Innerhalb der C-terminalen Aktivierungsdomänen von ScGal4 und K/Gal4 befindet sich eine Region, welche zwischen den beiden Proteinen sehr stark konserviert ist (16 von 18 Aminosäuren sind identisch) und durch den Inhibitor Gal80 gebunden wird (Johnston *et al.*, 1987, Lue *et al.*, 1987; Ma und Ptashne, 1987b; Dickson *et al.*, 1990; Salmeron *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 1996). Die starke Konservierung der Gal80-Bindedomäne spiegelt sich in der starken Konservierung der homologen Gal80-Proteine beider Hefen wider; die Homologie zwischen

beiden Proteinsequenzen erstreckt sich nahezu homogen über die gesamte Sequenz (Zenke *et al.*, 1993). Die Bindung von Gal80 an die Aktivierungsdomäne von Gal4 führt zur Inhibierung ihrer transkriptionsstimulierenden Aktivität. Bestimmte Mutationen in der Gal80-Bindedomäne von Gal4 führen, ebenso wie eine *gal80*-Deletion, zu einer konstitutiven Aktivierung der *GAL*-Gene (Dickson *et al.*, 1990; Johnston *et al.*, 1987; Salmeron *et al.*, 1990; Torchia *et al.*, 1984; Zenke *et al.*, 1993). Die Determinanten auf Gal4 für die Bindung und Inhibierung durch Gal80 überlappen mit den Determinanten für die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung; beide Funktionen können allerdings durch Punktmutationen getrennt werden (Ansari *et al.*, 1998; Salmeron *et al.*, 1990; Leuther *et al.*, 1993; Dickson *et al.*, 1990). Die starke Überlappung der Determinanten steht im Einklang mit einem Modell, nach welchem Gal80 direkt mit einem oder mehreren Zielproteinen der Transkriptionsmaschinerie um die Bindung an die Gal4-AD konkurriert. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen der ScGal4-AD und ScGal80 *in vitro* die Interaktionen der ScGal4-AD mit TBP (Ansari *et al.*, 1998) bzw. mit den Komplexen SAGA und NuA4 (Carrozza *et al.*, 2002) verhindert.

Das Gal80-Protein aus *S. cerevisiae* ist zur Di- und Tetramerisierung befähigt und bindet in dimerer Form an das ScGal4-Dimer (Melcher und Xu, 2001). ScGal80 scheint sehr sensitiv in Bezug auf den Austausch einzelner Aminosäuren zu reagieren; häufig sind Mutationen mit einem Verlust der strukturellen Integrität des Proteins verbunden (s. z.B. Melcher, 2005). In einer bestimmten Region allerdings, welche zwischen den beiden Gal80-Proteinen aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* nicht konserviert ist (der sogenannten „Linker“-Region), können Sequenzen ohne Verlust der Aktivität von ScGal80 bzw. KIGal80 inseriert werden (Nogi und Fukasawa, 1989; Zenke *et al.*, 1996). Die „Linker“-Region wird flankiert von den zwischen beiden Gal80-Proteinen am höchsten konservierten Sequenzblöcken. Die bislang charakterisierten Mutationen, welche dazu führen, dass die inhibitorische Aktivität von Gal80 *in vivo* nicht mehr aufgehoben werden kann (super-reprimierter Phänotyp), befinden sich innerhalb dieser Sequenzblöcke (Nogi *et al.*, 1977; Pilauri *et al.*, 2005). Gal80-Proteine aus *K. lactis* und *S. cerevisiae*, welche diese Mutationen tragen (Gal80-S0, -S1, -S2), sind nicht zur Interaktion mit KIGal1 bzw. ScGal3 befähigt (s. unten; Yano und Fukasawa, 1997; Zenke *et al.*, 1999), können aber weiterhin an Gal4 binden. Die Mutation der Variante Gal8031, welche den entgegengesetzten Phänotyp vermittelt (Nogi und Fukasawa, 1989) befindet sich zwischen den beiden veränderten Aminosäuren der Proteine Gal80-S0 und Gal80-S1. Die Proteine KIGal8031 bzw. ScGal8031 können an KIGal1 bzw. ScGal3 binden, sind aber nicht zur Interaktion mit Gal4 befähigt (Yun *et al.*, 1991; Zenke *et al.*, 1999).

KIGal80 wird, im Gegensatz zu ScGal80, reguliert phosphoryliert. Zenke *et al.* (1999) konnten zeigen, dass KIGal80 unter nicht induzierenden Bedingungen vorrangig in einer

phosphorylierten Form vorliegt und dass die Phosphorylierung dieses Proteins unter induzierenden Bedingungen verringert ist, wobei diese Verringerung von der regulatorischen Funktion des *KGal1*-Proteins abhängig ist. Befunde aus unserem Labor legen nahe, dass die regulierte Phosphorylierung von *KGal80* nicht direkt in die Regulation der Galaktose-Induktion involviert ist. So hat z.B. die Substitution der phosphorylierbaren Serin-Reste durch Alanin *in vivo* keinen signifikanten Einfluss auf die Regulation der *GAL*-Gene (Kapp, persönliche Mitteilung). Möglicherweise dient die regulierte Phosphorylierung von *KGal80*, ähnlich wie jene von *ScGal4*, einer Feinabstimmung der Induktion.

### 1.5. Aufhebung der Inhibierung

Die Zugabe von Galaktose zum Wachstumsmedium führt zur Überwindung der *Gal80*-abhängigen Inhibierung und damit zu einer Aktivierung von *Gal4*. Zur Induktion der *GAL*-Gene wird in *S. cerevisiae* das Protein *Gal3* und in *K. lactis* das dazu homologe bifunktionelle Protein *KGal1* benötigt (Bhat und Hopper, 1992; Bhat *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1991; Nogi, 1986; Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996).

*KGal1* besitzt neben dieser regulatorischen eine enzymatische Galaktokinase-Aktivität; das Protein katalysiert den ersten Schritt des Leloir-Stoffwechselweges und ist in dieser Funktion essentiell für die Metabolisierung von Galaktose. Die beiden Aktivitäten von *KGal1* sind durch Mutationen trennbar (Meyer *et al.*, 1991), d.h. die enzymatische Aktivität dieses Proteins wird für die Aktivierung der *GAL*-Gene nicht benötigt. Die beiden Funktionen des *KGal1* Proteins sind in *S. cerevisiae* auf zwei verschiedene Proteine, das regulatorische Protein *Gal3* und das enzymatische Protein *ScGal1*, aufgeteilt. Die Deletion von *GAL3* führt zu einer verzögerten Induktion der *GAL*-Gene nach Zugabe von Galaktose; diese Induktion geht vollständig verloren durch die zusätzliche Deletion von *ScGAL1* (Broach, 1979; Torchia und Hopper, 1986). Dies zeigt, dass die Funktion von *Gal3*, zumindest partiell, von *ScGal1* übernommen werden kann, dass also in *S. cerevisiae* eine gewisse Redundanz bezüglich der Aktivierungsfunktion des *GAL*-Regulons vorliegt. Die Sequenzen von *ScGal1*, *ScGal3* und *KGal1* sind zu 80% identisch. *ScGal3* ist offensichtlich eine enzymatisch inaktive Variante von *ScGal1*; die Insertion von 2 Aminosäuren in *ScGal3* führte zur Konvertierung dieses Proteins in eine Galaktokinase (Platt *et al.*, 2000). Die zwei Gene *ScGAL3* und *ScGAL1* in *S. cerevisiae* sind mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einer Duplikation des ursprünglichen *KGAL1*-Gens hervorgegangen (Wolfe und Shields, 1997).

Für längere Zeit war unklar, welche Rolle *KGal1* bzw. *ScGal3* im Prozess der Induktion der *GAL*-Gene spielen. Eine direkte Bindung zwischen *ScGal3* und *ScGal80* wurde erstmalig

von Bhat und Hopper (1992) vorgeschlagen. In darauf folgenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Proteine Gal80 und *K/Gal1* bzw. Gal3 *in vitro* miteinander interagieren können und dass diese Interaktion durch die Anwesenheit der Galaktokinase-Substrate Galaktose und ATP verstärkt wird (Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996; Yano und Fukasawa, 1997; Zenke *et al.*, 1996). Starke Hinweise auf eine direkte Interaktion der Proteine *in vivo* wurden durch den Austausch von Genen zwischen *K. lactis* und *S. cerevisiae* erhalten (Zenke *et al.*, 1996). In diesen Experimenten konnten weder *ScGAL3* noch *ScGAL1* den Phänotyp einer *Klgal1*-Mutation in *K. lactis* komplementieren; die Komplementation gelang erst, nachdem in dieser Mutante *KIGAL80* durch *ScGAL80* ersetzt wurde. CoIP-Experimente gaben Hinweise darauf, dass *ScGal3* im Vergleich zu *K/Gal1* nur relativ schwach mit *K/Gal80* interagiert, was ein Grund dafür sein könnte, dass *K/Gal1* in *K. lactis* nicht durch *ScGal3* ersetzt werden kann. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Gal3 bzw. *K/Gal1* zur Bindung an Gal80 mit der Fähigkeit zur Aktivierung der *GAL*-Gene *in vivo* korreliert (s. z.B. Blank *et al.*, 1997; Menezes *et al.*, 2003). Es herrscht heute allgemeiner Konsens darüber, dass das Schlüsselereignis bei der Induktion der *GAL*-Gene die durch Galaktose verstärkte Interaktion zwischen Gal80 und *K/Gal1* bzw. Gal3 ist.

Ein Punkt, welcher bis zum heutigen Tag noch nicht vollständig aufgeklärt ist, betrifft den Mechanismus der Aktivierung von Gal4 durch die Bindung zwischen Gal80 und *K/Gal1/ScGal3*. Zunächst wurden zwei grundlegende mechanistische Modelle vorgeschlagen (s. z.B. Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996). (i) Das Dissoziationsmodell besagt, dass die Bindung von *K/Gal1/Gal3* an Gal80 zur Dissoziation des Gal4-Gal80 Komplexes führt. Die einfachste Modellvorstellung beruht auf der Annahme einer direkten Konkurrenz zwischen *K/Gal1/Gal3* und Gal4 um die Bindung an Gal80, also einer Überlappung der Bindestellen dieser Proteine auf Gal80. (ii) Das allosterische Modell besagt, dass Gal80 gleichzeitig an Gal4 und *K/Gal1/Gal3* binden kann, dass also die Bindung von *K/Gal1/Gal3* an Gal4-gebundenes Gal80 zur Formation eines trimeren Komplexes führt. Gelegentlich wird dieses Modell gleichgesetzt mit einem Transformationsmodell, nach welchem die Bindung von *K/Gal1/Gal3* zu einer allosterischen Transformation (Konformationsänderung) von Gal80 (bzw. des Gal4-Gal80 Komplexes) führt, durch welche sich der Modus der Interaktion zwischen Gal4 und Gal80 verändert (was letztlich zu einer Freisetzung der Gal4-AD führt).

Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Galaktose-Induktion wurden vorrangig in *S. cerevisiae* und mit den regulatorischen Proteinen aus diesem Organismus durchgeführt. Auf der Basis von Experimenten, welche die Beständigkeit einer Gal4-Gal80-Zweihybrid-Interaktion nach Zugabe von Galaktose zeigten, schlugen Leuther und Johnston (1992) eine Transformation des Gal4-Gal80-Komplexes im Zuge der Galaktose-Induktion vor. In Übereinstimmung mit einem allosterischen Modell der Galaktose-Induktion wurde berichtet, dass gereinigtes Gal4 aus induzierten Zellen mit Gal80 assoziiert war (Parthun und

Jaehning, 1992). Zudem konnten Platt und Reece (1998) *in vitro* die Formation eines trimeren Komplexes aus Gal4, Gal80 und Gal3 nachweisen. Zur Bildung eines solchen Komplexes war ein 30-facher molarer Überschuss von Gal3 gegenüber Gal80 nötig.

Sil *et al.* (1999) konnten zeigen, dass die Interaktion zwischen Gal4 und Gal80 *in vitro* in Abhängigkeit von Gal3 (insbesondere in Anwesenheit von Galaktose und ATP) destabilisiert wird. Um diese Ergebnisse mit denen von Platt und Reece (1998) in Einklang zu bringen, schlugen die Autoren ein „two site model“ vor, welches besagt, dass Gal4 und Gal80 durch jeweils zwei verschiedene Epitope miteinander interagieren können. Ein Interaktionsmodus maskiert demnach die C-terminale Gal4-AD und wird durch die Bindung von Gal3 an Gal80 behindert (Gal3 kompetiert also gegen diese Interaktion), wohingegen die „alternative“ (und schwächere) Interaktion zwischen Gal4 und Gal80 von Gal3 nicht beeinflusst wird. Entsprechend konnten die Autoren eine von Gal3 unabhängige Zweihybrid-Interaktion zwischen Gal80 und einem internen Bereich von Gal4 zeigen.

Die Bildung eines trimeren Komplexes *in vivo* wurde insbesondere durch neuere Arbeiten in Frage gestellt. So konnte gezeigt werden, dass Gal3 in *S. cerevisiae* vorrangig, wenn nicht gar vollständig, im Cytoplasma lokalisiert ist, wohingegen Gal80 zwischen Kern und Cytoplasma shuttle kann (Peng und Hopper, 2000). Diese intrazelluläre Lokalisation der Regulatoren legt nahe, dass die Interaktion zwischen Gal3 und Gal80 in *S. cerevisiae* ausschließlich im Cytoplasma stattfindet und schließt somit die Bildung eines trimeren Gal4-Gal80-Gal3-Komplexes im Kern aus. In Übereinstimmung mit einem Dissoziationsmodell konnten Peng und Hopper (2002) zeigen, dass der forcierte Ausschluss von Gal3 aus dem Kern durch Verankerung dieses Proteins in zellulären Membranen keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit der *GAL*-Gene hat und dass im Zuge der Galaktose-Induktion die Assoziation von Gal80 mit den Promotoren der *GAL*-Gene reduziert wird. Des Weiteren führte die Verankerung von Gal3 an zelluläre Membranen in Galaktose-gewachsenen Zellen zu einer Umverteilung von Gal80 an diese Membranen. Nach dem einfachsten Modell, welches aus diesen Ergebnissen resultiert, wird im Zuge der Galaktose-Induktion die nukleäre Konzentration von Gal80 durch eine verstärkte Gal3-Gal80-Interaktion im Cytoplasma verringert, was zu einer verstärkten Freisetzung der Gal4-AD und damit zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Aktivierung der *GAL*-Gene führt.

## 1.6. Gegenstand der Arbeit

Sowohl die Menge an Wissen über die Regulation der *GAL*-Gene in Abhängigkeit von Galaktose als auch die relativ einfache Struktur des zu Grunde liegenden regulatorischen Netz-

werkes lassen dieses System als geeignetes Objekt für eine mathematische Modellierung erscheinen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, ein einfaches mathematisches Modell zur Beschreibung des Galaktose-Schalters in *K. lactis* zu erstellen. Hierbei sollte analysiert werden, welche grundsätzlichen Modellannahmen (unter Berücksichtigung vorgegebener quantitativer Rahmenbedingungen) die Konstruktion eines effizienten Schalters erlauben. *S. cerevisiae* besitzt bezüglich der Aktivierungsfunktion des GAL-Regulons eine gewisse Redundanz, welche in *K. lactis* auf Grund der Vereinigung der Funktionen von ScGal3 und ScGal1 in einem bifunktionellen Protein (*KIGal1*) nicht auftritt. Unter anderem aus diesem Grund scheint das System aus *K. lactis* für eine mathematische Modellierung zugänglicher zu sein.

Die Interaktionen zwischen den regulatorischen Proteinen aus *K. lactis* sind bislang schlechter charakterisiert worden als jene der Regulatoren aus *S. cerevisiae*. Dies betrifft unter anderem die Zusammensetzung der gebildeten Proteinkomplexe und die Quantifizierung der Interaktionsstärken. Für eine quantitative mathematische Modellierung, wie sie in dieser Arbeit angestrebt wurde, sind derartige Informationen allerdings erforderlich. Aus diesem Grund sollten während der Arbeit die Interaktionen zwischen den Regulatoren aus *K. lactis* experimentell charakterisiert und quantifiziert werden. Zudem sollten weitere, für die Modellierung wichtige Parameter wie intrazelluläre Lokalisationen und Konzentrationen der Regulatoren untersucht werden.

Es gab bereits im Vorfeld Arbeiten, in denen ein (relativ komplexes) mathematisches Modell zur Beschreibung des Schaltvorganges in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* auf der Basis eines kompetitiven Mechanismus vorgestellt wurde (Verma *et al.*, 2003, 2004). Ein kritischer Punkt dieses Modells war das fehlende Wissen zur Interaktionsstärke der beiden Regulatoren Gal3 und Gal80. Dieser Parameter allerdings spielt in Hinsicht auf die Operation des Galaktose-Schalters, insbesondere bei Annahme einer Competition zwischen Gal4 und Gal3 um die Bindung an Gal80, eine entscheidende Rolle. Entsprechend der Interaktionsmodi zwischen den Regulatoren, welche in dem mathematischen Modell vorgegeben worden waren, musste für die Gal3-Gal80-Interaktion eine sehr hohe Affinität angenommen werden. Obwohl dies nicht explizit diskutiert worden war, scheint diese Annahme essentiell für das Funktionieren des vorgestellten mathematischen Modells zu sein.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die der Gal3-Gal80-Bindung entsprechende Interaktion zwischen den Proteinen *KIGal1* und *KIGal80* aus *K. lactis* *in vitro* quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Interaktion mit relativ niedriger Affinität erfolgt und wesentlich schwächer ist als jene, welche in den oben erwähnten mathematischen Modellen für die Gal3-Gal80-Interaktion angenommen wurde. In der Arbeit wird gezeigt werden, dass trotz dieser relativ schwachen *KIGal1-KIGal80*-Interaktion ein effizienter Galaktose-Schalter auf der Basis eines kompetitiven Modells konstruiert werden kann.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. *Kluyveromyces lactis* Stämme

JA6                     $\alpha$  *ade1 adeT ura3 trp1-11 LAC9-2*                    (Breunig und Kuger, 1987)

Die folgenden Stämme sind bis auf die angegebenen Loci isogen zu JA6. Für Disruptionen bzw. Integrationen wurde das *URA3*-Gen von *S. cerevisiae* verwendet.

JA6/80HisR	<i>GAL80-IHIS</i>	(Anders, 2001)
JA6/D1R	<i>gal1::ura3</i>	(Zacchariae, 1994)
JA6/D1D802R	<i>gal1::ura3 gal80-<math>\Delta</math>2 ::ura3</i>	(Zacchariae, 1994)
JA6/G80-2	<i>gal80-<math>\Delta</math>1::ura3 URA3 GAL80 URA3 GAL80</i>	(Klose, 2004)
JA6/HisG80PT	<i>gal80-<math>\Delta</math>1::ura3 TRP1 GAL80-NHIS</i>	(Klose, 2004)
JA6/Z3	<i>LAC9-2XR URA3 LAC9-2XR</i>	(Zacchariae, 1994)

### 2.2. *Escherichia coli* Stämme

DH5 $\alpha$                     F<sup>-</sup> 80*lacZ* M15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>)  
*phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* (Invitrogen)

Rosetta(DE3)-pLys    F<sup>'</sup> *ompT hsdSB* (*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal dcm lacY1* (DE3) *pLysS*(Cm<sup>R</sup>) (Novagen)

### 2.3. Medien für die Anzucht

Die Anzucht der *K. lactis* Stämme erfolgte bei 30°C in supplementiertem Minimalmedium (SM). Flüssigkulturen wurden zur besseren Belüftung kontinuierlich geschüttelt. Das Minimalmedium, bestehend aus 0,67% YNB (yeast nitrogen base w/o amino acids) wurde mit einem Aminosäure/Basen-Mix (11 mg/l Ade; 14 mg/l Tyr; je 38 mg/l Ura, His, Trp, Arg, Met; 48 mg/l Phe; je 58 mg/l Leu, Ile, Lys, Val, Thr) supplementiert. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde die entsprechende Aminosäure oder Base nicht zugesetzt. Als Kohlenstoffquellen dienten 2% Galaktose (Gal), 2% Glukose (Glu) oder 3% Glycerin (Gly).

*E. coli* wurde in Vollmedium (LB: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl) bei 37°C angezogen. Flüssigkulturen wurden geschüttelt. Zur Selektion von Transformanten wurde dem Medium Ampicillin (Amp) in einer Konzentration von 100 mg/l zugesetzt. Platten wurden mit 2% Agar hergestellt.

#### 2.4. Plasmide

p80GUS (Zenke *et al.*, 1993): *KIGAL80-GUS*-Fusionsplasmid mit *KIGAL80*-Promotor. *GUS* ist an die ersten 24 Aminosäuren des *KIGAL80*-Gens fusioniert.

pC80GUS (Zenke *et al.*, 1993): *K. lactis* Centromerplasmid mit *GUS*-Reporterfusion an den *KIGAL80*-Promotor.

pCGFPAG1 (Bürkner): *K. lactis* Centromerplasmid; codiert für GFP-*KIGal1*-Fusionsprotein unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors.

pCR-KIG80BH (Kapp): Enthält das *KIGAL80*-Gen, welches durch eine PCR-Reaktion amplifiziert und in das Plasmid pCR2.1 (Invitrogen) inseriert wurde. Am 5'-Bereich wurde eine *Bam*HI-Schnittstelle eingefügt und das Startcodon entfernt. Am 3'-Ende des translatierten Bereichs des *KIGAL80*-Gens wurde eine *Hind*III-Schnittstelle eingefügt.

pEAG1 (Zachariae, 1994): *K. lactis* Multikopieplasmid mit *KIGAL1* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors.

pEAG80 (Zenke, 1995): *K. lactis* Multikopieplasmid mit *KIGAL80* unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors.

pETNHG80 (=pETG80BH; Kapp): *E. coli* Expressionsplasmid, welches für die N-terminal 6xHis-markierte *KIGal80*-Variante NHGal80 codiert. Ein 1,4 kb *Bam*HI-*Bpu*1102I Fragment aus dem Plasmid pQEG80BH wurde in den entsprechend geschnittenen Vektor pET15b (Novagen) kloniert.

pETNHG80-S0, pETNHG80-S2 (Kapp): Derivate von pETNHG80 zur Expression der N-terminal 6xHis-markierten Proteinvarianten NHGal80-S0 bzw. NHGal80-S2. Beide Proteinvarianten unterscheiden sich vom Wildtypprotein durch jeweils einen Aminosäureaustausch ( $G_{300} \rightarrow R$  bzw.  $E_{367} \rightarrow K$ ; Nummerierungen der Aminosäuren beziehen sich auf das *KIGal80*-Wildtypprotein ohne His-Markierung).

pGSTGal1 (Zenke *et al.*, 1999): Multikopie-Plasmid, welches für ein Gst-*KIGal1*-Fusionsprotein unter Kontrolle des *ScADH*-Promotors codiert.

pKATUC41 (Zenke *et al.*, 1993): *K. lactis* Vektor mit *KICEN2-ARS1-KARS12-ScTRP1-ScURA3*.

pKIGal8031 (Zenke *et al.*, 1999): *E. coli* Vektor; codiert für die *KIGal80*-Variante *KIGal8031* mit Aminosäureaustausch  $G_{311} \rightarrow R$  (im Vergleich zum *KIGal80*-Wildtypprotein).

- pKIGal80His (Zenke 1995): *E. coli* Vektor; codiert für KIGal80-Protein mit interner 6xHis-Markierung (in dieser Arbeit als Protein IHGal80 bezeichnet)
- pQEG80BH (Kapp): *E. coli* Expressionsplasmid. Ein 1,4 kb *Bam*HI-*Hind*III-Fragment aus dem Plasmid pCR-KIG80BH wurde in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor pQE9 (Qiagen) inseriert.
- pRJR229 (Wu *et al.*, 1996): *E. coli* Expressionsplasmid basierend auf dem Vektor pET21d (Novagen) zur Expression einer miniScGal4-Variante, welche die Aminosäuren 1-100 + 840-881 des ScGal4-Wildtypproteins enthält.

Für diese Arbeit wurden folgende Plasmide konstruiert:

- p1IHG80: Das 1,1 kb *Nde*I-*Swa*I-Fragment aus pKIGal80His wurde in den *Nde*I-*Ecl*136II-geschnittenen Vektor pET21c (Novagen) kloniert.
- p3IHG80: Der N-terminale Teil des offenen Leserahmens von *KIGAL80* wurde mit den Primern *Nde*I-KIGAL80-fw und KIGAL80-839C amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde nach Restriktion mit *Nde*I und *Mun*I in den *Nde*I-*Eco*RI-geschnittenen Vektor p1IHG80 kloniert.
- p80GUS-DUAS2: Derivat von p80GUS mit partiell deletierter distaler Gal4-Bindestelle (UASII; Zenke *et al.*, 1993) im *KIGAL80*-Promotor. p80GUS wurde mit *Bbs*I und *Bsu*36I geschnitten und nach Auffüllen der 5' überhängenden Enden religiert. Daraus resultiert die Deletion einer der beiden für die Gal4-Bindung essentiellen palindromischen Sequenzen (CGG deletiert aus CGGN<sub>1</sub>CCG).
- pC80GUS-DUAS2: *K. lactis* Centromerplasmid mit *GUS*-Reportergenfusion an den *KIGAL80*-Promotor mit partiell deletierter distaler Gal4-Bindestelle. Das 6,1 kb *Sac*I-*Asp*718I-Fragment aus pKATUC41 wurde in das entsprechend geschnittene Plasmid p80GUS-DUAS2 kloniert.
- pCGFPAG1-ura3Δ: Derivat von pCGFPAG1; durch Insertion eines doppelsträngigen Oligonukleotids wurde eine frame-shift-Mutation in das *URA3*-Gen eingebracht. Das durch Annealing der beiden einzelsträngigen Oligonukleotide Insert-Ura3-1 und Insert-Ura3-2 gebildete doppelsträngige Fragment wurde in das *Ppu*MI-geschnittene Plasmid pCGFPAG1 inseriert. Die erfolgreiche Ligation wurde anhand der neu entstandenen *Bsp*TI-Schnittstelle überprüft.
- pETIHG80: *E. coli* Expressionsplasmid, welches für die intern 6xHis-markierte KIGal80-Variante IHGal80 codiert. Das 1,1 kb *Bsr*GI-*Bst*BI-Fragment aus pKIGal80His wurde in den entsprechend geschnittenen Vektor p3IHG80 kloniert.
- pETNHG1: *E. coli* Expressionsplasmid zur Expression der N-terminal 6xHis-markierten KIGal1-Variante NHGal1. Der offene Leserahmen (ORF) von *KIGAL1* wurde durch

PCR (mit *Pfu*-Polymerase) mit den Primern *Nde*I-KIGAL1-fw und *Xho*I-KIGAL1-rv amplifiziert. Dadurch wurde am 5'-Ende des ORF, überlappend mit dem Startcodon, eine *Nde*I-Schnittstelle und unmittelbar hinter das Stopcodon eine *Xho*I-Schnittstelle eingefügt. Das erhaltene PCR-Fragment wurde nach Restriktion mit *Nde*I und *Xho*I in den entsprechend geschnittenen Vektor pET15b (Novagen) kloniert.

pETNHG8031: Derivat von pETNHG80 zur Expression der N-terminal 6xHis-markierten *K*Gal80-Variante NHGal8031 mit Aminosäureaustausch G<sub>311</sub>→R (Nummerierung bezieht sich auf das *K*Gal80-Wildtypprotein ohne His-Markierung). Das *Bsr*GI-*Bst*BI-Fragment aus pKGal8031 wurde in den entsprechend geschnittenen Vektor pETNHG80 kloniert.

## 2.5. Oligonukleotide

Die Sequenzen sind in 5' → 3' Richtung aufgeführt. Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen; die entsprechenden Enzymnamen sind in Klammern aufgeführt.

Insert-Ura3-1	GTCGG <u>CTTAAG</u> TC	( <i>Bsp</i> TI)
Insert-Ura3-2	GACGACT <u>TAAG</u> CC	( <i>Bsp</i> TI)

Die nachfolgenden Oligonukleotide wurden als Primer bei PCR-Reaktionen verwendet. Basen, welche zum entsprechenden Matrizenstrang nicht komplementär sind, wurden klein geschrieben.

<i>Nde</i> I-KIGAL1-fw	actgcatATGTCCGTTCCCTATTGTGC	( <i>Nde</i> I)
<i>Xho</i> I-KIGAL1-rv	actgctcgagCTATTCATATAAGACACTACCCAG	( <i>Xho</i> I)
<i>Nde</i> I-KIGAL80-fw	actgcatATGAACAATAACAAACGGTCC	( <i>Nde</i> I)
KIGAL80-839C	AGCTGCAAGATACGGGTACC	

## 2.6. Synthetisches Peptid (*K*Gal4-AD)

Ein Peptid mit der Sequenz der 22 C-terminalen Aminosäuren von *K*Gal4 (TQQLF NTTTM DDVYN YIFDN DE) wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. Frank Bordusa von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle zur Verfügung gestellt. Das Peptid wurde durch Festphasenpeptidsynthese mit der Fmoc-Strategie synthetisiert.

## 2.7. PCR-Reaktionen und enzymatische Modifikationen von DNA

Enzymatische Modifikationen von DNA und die PCR-Reaktionen wurden mit Enzymen des Herstellers Fermentas nach dessen Empfehlungen durchgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden entsprechend des verwendeten Enzyms (*Pfu*- bzw. *Taq*-Polymerase), der eingesetzten Primer und der Größe des erwarteten Produktes angepasst.

## 2.8. Präparation von *K. lactis* Zellen für Fluoreszenz-Mikroskopie

1 ml der Zellkultur wurde abgenommen und durch Zentrifugation, Abnahme des Überstandes und anschließende Resuspension in Anzuchtmedium 20x aufkonzentriert. Die aufkonzentrierte Zellsuspension wurde mit einem gleichen Volumen Fixierlösung (4% Formaldehyd in PBS [10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,2; 150 mM NaCl]) vermischt und für ca. 3 min inkubiert. 10 µl dieser Suspension wurden auf einen Objektträger aufgetropft und die Zellen durch leichtes Andrücken mit einem Deckgläschen auf dem Objektträger arretiert. Das Präparat wurde für ca. 30 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend in PBS gespült und kurz abgetropft. Die Zellen auf dem Objektträger wurden mit DAPI-Lösung (3 µM DAPI in PBS) überschichtet und mit einem Deckgläschen bedeckt. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem Zeiss Axioscop Fluoreszenzmikroskop mit den entsprechenden Anregungsfiltern über eine CCD-Kamera (Photometrix) aufgenommen. Die erzeugten Bilddateien wurden mit der Software Adobe Photoshop bearbeitet.

## 2.9. Herstellung von Proteinextrakten aus *K. lactis*

### 2.9.1. Extraktion nativer Proteine mittels Glasperlenaufschluss

Die Extraktion nativer Proteine aus Hefezellen erfolgte mittels Glasperlen-Aufschluss. 20-100 ml einer in Flüssigmedium gewachsenen Hefekultur wurden geerntet und auf Eis abgekühlt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Die Zellen wurden abzentrifugiert, das Pellet mit 5 ml eiskaltem Aufschlusspuffer (5 mM Tris/HCl pH 7,8; 5% w/v Glycerin; 10 mM KCl; 7 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen und anschließend in 500 µl dieses Puffers resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt; der Aufschluss der Zellen erfolgte nach Zugabe von 500 µl Glasperlen (Durchmesser ≈ 0,5 mm) für 2 x 3 min in einem Vortexer. Der Überstand wurde abgenommen und für 10 min bei 20.000xg zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand (=Proteinextrakt) wurde in ein frisches Re-

aktionsgefäß überführt und entweder sofort eingesetzt (für enzymatische Messungen) oder bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert (für Westernanalyse).

### 2.9.2. Aufschluss von *K. lactis* Zellen durch SDS-Lysispuffer

Die in dieser Arbeit angewandte Methode basiert auf der in Ghaemmaghami *et al.* (2003) beschriebenen und eignet sich unter anderem zur Herstellung von Proteinextrakt für nachfolgende (quantitative) Westernanalysen. Hierfür wurde einer Zellsuspension eine definierte Zellmenge, entsprechend 1 OD-Einheit [ODE; ergibt sich aus Volumen (ml)  $\cdot$  OD<sub>600</sub>], entnommen. Die Zellen wurden pelletiert, nach Abnahme des Überstandes in SDS-Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 % SDS; 5% Glycerin; 50 mM DTT; Bromphenolblau; 1x complete Protease-Inhibitor [Roche Diagnostics]) resuspendiert und sofort für 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wurde der Überstand entnommen und bis zur weiteren Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.10. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) mit dem „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (Bio-Rad). Als Standard diente jeweils Rinderserumalbumin.

### 2.11. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Proteine wurden in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen in Anwesenheit von SDS nach der Methode von Laemmli (1970) aufgetrennt. Es wurden 5%ige Sammelgele (Sammelgelpuffer: 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS) und 10%ige oder 12,5%ige Trenngele (Trenngelpuffer: 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS) verwendet. Die Proteinbanden wurde durch Färbung in Coomassie-Lösung (7,5% Essigsäure; 50% Methanol; 0,1% Coomassie Brilliant Blue) und anschließender Entfärbung durch Aufkochen des Gels in Wasser sichtbar gemacht.

## 2.12. Immunologischer Nachweis der 6xHis-markierten Proteine

Die Proteine wurden durch Elektrotransfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Immobilon P, Millipore) transferiert. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % Methanol v/v) bei 4 °C mit 100 V für 1 Stunde. Die Membran wurde für mindestens 1 Stunde in TBST (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,3% Tween 20) mit 5% Milchpulver (=TBSTM) blockiert und dann für 2 Stunden oder über Nacht mit dem in TBSTM 1:1000 verdünnten primären Antikörper (Anti-penta-His-IgG aus Maus; Qiagen) inkubiert. Nach 3-fachem 10-minütigen Waschen in TBST erfolgte eine Inkubation der Membran für 2 Stunden mit dem an alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:5000 in TBSTM; Jackson Immunoresearch Lab.). Die Membran wurde anschließend 3x 10 Minuten in TBST gewaschen. Der Nachweis des AP-gekoppelten Antikörpers erfolgte durch eine Farbreaktion mit 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP; 0,14 mg/ml) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT; 1mg/ml) in Puffer P3 (100 mM Tris/HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

## 2.13. Expression und Reinigung von Proteinen

### 2.13.1. Expression und Reinigung von K/Gal80

Die verschiedenen K/Gal80-Varianten wurden jeweils auf Basis des pET-Systems (Novagen) exprimiert. Als Expressionsstamm diente *E. coli* Rosetta(DE3)-pLys. Die mit dem jeweiligen Expressionsplasmid transformierten Zellen wurden auf LB-Medium (1% Trypton; 0,5% Hefe-Extrakt; 0,5% NaCl) mit 35 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Ampicillin (= LB Cam Amp) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 - 2 vorgezogen. Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Zellen in Induktionsmedium (LB Cam Amp + 200 mM M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1,5 % Laktose) überführt (OD<sub>600</sub> zwischen 0,1 und 0,2) und anschließend für 12-15 Stunden bei 26°C geschüttelt. Das nach Ernte und Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Aufschluss bei -20°C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte nach Resuspension des Zellpellets in Aufschlusspuffer (50 mM Tris; 20 mM NaCitrat; 10 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,1% Tween 20; pH 8,0) durch Ultraschallbehandlung. Das erhaltene Rohextrakt wurde zur Präzipitation von Nukleinsäuren mit 0,05% Protaminsulfat versetzt. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte (10 min bei 10.000 rpm und nach Überführen des Überstandes in ein neues Gefäß 20 min bei 20.000 rpm). Der daraus resultierende Überstand wurde auf eine mit Ni-NTA-Sepharose (Ni-NTA Superflow von Qiagen oder Ni-Sepharose Fast Flow von Amersham) befüllte und in Aufschlusspuffer

äquiliibrierte Säule überführt. Nach Durchfluss des Rohextraktes wurde die Säulenmatrix mit Waschpuffer (Aufschlusspuffer + 40 mM Imidazol; pH 8,0) gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer (Aufschlusspuffer + 250 mM Imidazol; pH 8,0). Je nach Verwendungszweck wurde das Protein sofort nach Zugabe von 10% (w/v) Glycerin oder nach Dialyse (über Nacht) gegen Dialysepuffer [20 mM Tris/HCl pH 8,0; 10% (w/v) Glycerin; 20 mM NaCitrat] in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

### 2.13.2. Expression und Reinigung von *K/Gal1*

#### 2.13.2.1. Expression und Reinigung von *GstGal1*

Die Expression eines *Gst-K/Gal1*-Fusionsproteins (*GstGal1*) erfolgte vom Plasmid *pGstGal1* in Zellen des *Klgal1-Klgal80*-Deletionsstammes JA6/D1D802R. Die Zellen wurden über Nacht in selektivem SM-Glukose-Medium (ohne Uracil) angezogen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Glasperlen in Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 0,1% Tween 20; 1,4 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol). Der nach 20-minütiger Zentrifugation bei 20.000 rpm erhaltene Rohextrakt wurde auf eine mit *Gst*-Sepharose FF (Pharmacia) befüllte und in Aufschlusspuffer äquiliibrierte Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit Aufschlusspuffer erfolgte die Elution des Proteins mit Elutionspuffer (Aufschlusspuffer + 20 mM reduziertes Glutathion). Nach Dialyse über Nacht gegen Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 20% Glycerin) wurde die Proteinlösung aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### 2.13.2.2. Expression und Reinigung von *NHGal1*

Die Expression eines 6xHis-markierten *K/Gal1*-Fusionsproteins (*NHGal1*) erfolgte vom Plasmid *pETNHG1* im *E. coli* Expressionsstamm Rosetta(DE3)-pLys. Expression und Reinigung erfolgten analog zu den Prozeduren zur Gewinnung des *K/Gal80*-Proteins aus *E. coli* (s. Abschnitt 2.13.1), mit der Ausnahme, dass der Waschpuffer in diesem Fall lediglich 20 mM Imidazol enthielt. Durch diese Ein-Schritt-Reinigung konnte *NHGal1* nur ungenügend gereinigt werden (schätzungsweise 50-70% rein); das Eluat enthielt stets Verunreinigungen anderer Proteine. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Reinigungsschritt mittels präparativer Gelfiltration (Laufpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% Glycerin; 500 mM NaCl) angeschlossen. Die durch diese Prozedur erhaltenen Fraktionen mit hoher Reinheit des *NHGal1*-Proteins wurden vereinigt und entweder über Nacht gegen den gewünschten Puffer (i.d.R.

Dialysepuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 20% Glycerin) dialysiert oder nach Aliquotieren und Einfrieren in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

### 2.13.3. Expression und Reinigung von miniScGal4

Die Expression der miniScGal4-Variante, welche die Aminosäuren 1-100+840-881 des ScGal4-Wildtypproteins enthält, erfolgte von dem Plasmid pRJR229 im Expressionsstamm BL21(DE3)-pLys (Novagen). Expression und Reinigung dieses Proteins wurden wie in Reece und Ptashne (1993) beschrieben durchgeführt. Gereinigtes miniScGal4-Protein wurde mir freundlicherweise von meinem ehemaligen Mitarbeiter L. Kapp zur Verfügung gestellt.

## 2.14. Messung von Enzymaktivitäten

### 2.14.1. Messung von $\beta$ -Galaktosidase- und $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität mit Proteinextrakt

Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach Miller (1972) bei 30 °C in 500  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Puffer (5 mM Tris/HCl pH 7,8; 10 mM KCl; 5% Glycerin; 4 mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid [ONPG]). Nach Zugabe von Proteinextrakt wurde die Reaktion photometrisch bei 420 nm über einen Zeitraum von 3 min verfolgt. Bei Berechnung der Enzymaktivität wurde ein Extinktionskoeffizient von 4500  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$  für o-Nitrophenol verwendet.

Die Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase (GUS) wurde nach Jefferson (1987) bei 37 °C in 500  $\mu$ l GUS-Puffer (50 mM Na-Phosphat pH 7,0; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 1,25 mM p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Glukuronid) bestimmt. Die Reaktion wurde photometrisch bei 415 nm über einen Zeitraum von 3 min verfolgt. Bei Berechnung der Enzymaktivität wurde ein Extinktionskoeffizient von 8800  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$  für p-Nitrophenol verwendet.

### 2.14.2. Messung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Flüssig-Zellkulturen von *K. lactis*

Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ohne vorherige Proteinextraktion erfolgte leicht modifiziert nach Klose (2004). Direkt vor der Probenahme wurde die  $OD_{600}$  der Zellkultur bestimmt. 1 ml der Kultur wurde entnommen und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Z-Puffer (100 mM Na-Phosphat pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM  $MgSO_4$ ) gewaschen, erneut abzentrifugiert und anschließend in 300  $\mu$ l dieses Puffers resuspendiert. Der Quotient aus dem geernteten Volumen und dem Volumen, auf das die Zellen eingeeengt wur-

den (i.d.R. 300  $\mu$ l), geht als Konzentrationsfaktor in die Formel zur Berechnung der Aktivität ein (siehe unten). 100  $\mu$ l der eingeeengten Hefezellsuspension wurden zur Permeabilisierung der Zellen eingesetzt. Dazu wurde die Probe abwechselnd 30 s in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend 1 min. bei 37 °C vollständig wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde 3x nacheinander durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 700  $\mu$ l ZM-Puffer (Z-Puffer + 0,27 %  $\beta$ -Mercaptoethanol). Zum Start der Reaktion wurden 160  $\mu$ l ONPG-Lösung (4 mg/ml o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid in Z-Puffer) zugesetzt. Die Proben wurden bis zum Aufweisen einer leichten Gelbfärbung bei 30 °C inkubiert. Durch Zugabe von 400  $\mu$ l 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  wurde die Reaktion gestoppt, wobei die Dauer der Reaktion (Inkubationszeit) dokumentiert wurde. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert (10 min., 14000 rpm, RT) und der Überstand in Küvetten überführt. Die optische Dichte wurde photometrisch bei 420 nm bestimmt. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Aktivität (Miller-Units)} = (1000 \cdot \text{OD}_{420}) / (t \cdot V \cdot \text{OD}_{600}),$$

wobei: t = Inkubationszeit in Minuten; V = 0,1 ml · Konzentrationsfaktor;  $\text{OD}_{600}$  = optische Dichte der Zellkultur.

### 2.14.3. Messung der Galaktokinase-Aktivität mit gereinigtem *K/Gal1* und Durchführung der Galaktokinase-Inhibierungsexperimente

Die durch *K/Gal1* katalysierte Reaktion (Galaktose + ATP  $\rightarrow$  Galaktose-1-Phosphat + ADP) und der damit verbundene Verbrauch an ATP wurde mit Hilfe eines gekoppelten Enzymtests gemessen. Die Methode wurde mit leichten Modifikationen aus Engels (1999) übernommen. Der Reaktionsansatz wurde jeweils frisch zubereitet und enthielt stets: 100 mM Tris/HCl pH 7,9; 10 mM KCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 300  $\mu$ g/ml BSA; 1 mM Fruktose-1,6-bisphosphat; 0,25 mM NADH; 2 mM PEP; 1 mM ATP [nach Engels (1999) beträgt der  $K_m$ -Wert von *K/Gal1* für ATP ca. 90 nM] und 6,6 bzw. 13,5 U/ml der Enzyme Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase (Feinchemikalien und Enzyme von Sigma). Bei Messung unter Hochsalzbedingungen enthielt der Ansatz zusätzlich 100 mM K-Acetat (KAc). KAc wurde gewählt, da es als einziges der getesteten Salze keinen negativen Einfluss auf die gemessene Galaktokinase-Aktivität ausübte. Die Mixtur wurde jeweils vor der Messung für ca. 5 min bei 30 °C inkubiert. *K/Gal1* wurde kurz vor dem Start der Messung zum Reaktionsansatz zugegeben (jeweils zwischen 5 und 15 nM); sofern nicht anders erwähnt, erfolgten sämtliche in dieser Arbeit vorgestellten Aktivitätsmessungen mit der *K/Gal1*-Variante *GstGal1*. Die Reaktion erfolgte bei 30 °C und wurde durch Zugabe von 50 mM Galaktose zum Reaktionsansatz gestartet (nach eigenen Messungen beträgt der  $K_m$ -Wert von *K/Gal1* für Galaktose ca. 3-8 mM). Der NADH-Verbrauch wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm über einen Zeitraum von

3-5 min gemessen. Bei Bedarf wurde mit der so gemessenen Extinktionsabnahme ( $\Delta A_{340}/\text{min}$ ) die Aktivität der Galaktokinase unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten von NADH ( $6,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) berechnet, wofür sich bei den verwendeten Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm folgende vereinfachte Formel ergibt:

$$\text{Aktivität (U/mg)} = \Delta A_{340} (\text{min}^{-1}) \cdot 10^3 / ([\text{Gal1}] (\mu\text{g/ml}) \cdot 6,3).$$

[Gal1] bezeichnet hierbei die Konzentration von *K*/Gal1 im Reaktionsansatz.

Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Galaktokinase-Inhibierungsexperimenten wurden jeweils mehrere Proben parallel gemessen (maximal 6 parallele Messungen waren mit dem verwendeten Photometer [Beckman DU 640] möglich). Eine entsprechende Menge des Reaktionsgemisches wurde zu diesem Zweck bei 30°C präinkubiert, mit *K*/Gal1 versetzt (ca. 10 nM) und auf die einzelnen Küvetten aufgeteilt (jeweils 475 µl eines 20/19x Reaktionsgemisches). So wurde sichergestellt, dass in allen parallel gemessenen Ansätzen die gleiche Menge an *K*/Gal1 vorhanden war. Einer dieser Ansätze, zu welchem kein zusätzliches Protein zugegeben wurde, diente jeweils als Referenz. Die Galaktokinase-Aktivitäten der Proben, welche weiteres Protein enthielten (Gal80 und/oder Gal4) wurden jeweils relativ zu diesem Referenzansatz ermittelt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20x Galaktose-Lösung (25 µl 1 M Galaktose) gestartet und die Abnahme von NADH über einen Zeitraum von 3-5 min photometrisch verfolgt. Es wurde sichergestellt, dass die Galaktokinase-Aktivität über den Zeitraum, welcher zur Auswertung benutzt wurde, konstant war (lineare Abnahme der Extinktion bei 340 nm).

#### 2.14.4. Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität im Zellextrakt

Mit dem gekoppelten enzymatischen Test wird neben der Galaktokinase-Aktivität jegliche andere ATPase-Aktivität des Zellextraktes erfasst. Aus diesem Grund erfolgte jede Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität eines Zellextraktes als Doppelbestimmung, wobei nur in einen der beiden Ansätze Galaktose zugegeben wurde (in den Referenzansatz wurde das gleiche Volumen an Wasser zugesetzt). Die Aktivität der Galaktokinase wurde dann als Differenz der Aktivitäten zwischen beiden Ansätzen berechnet.

## 2.15. Mathematische Methoden

### 2.15.1. Durchführung von Simulationen mit den mathematischen Gleichgewichtsmodellen

Die Simulationen mit den mathematischen Modellen erfolgten mit Hilfe des Programmes Octave, Version 2.1.36 (<http://www.octave.org>). Die den Modellen zu Grunde liegenden Gleichungssysteme wurden mit der in Octave integrierten Funktion `fsolve` gelöst.

### 2.15.2. Parameterschätzung (Ermittlung der Interaktionsparameter)

Die Ermittlung des apparenten  $K_D$ -Wertes ( $K_{D,app}$ ) der *K/Gal1-K/Gal80*-Interaktion in Anwesenheit von Galaktose erfolgte auf der Basis der Tatsache, dass die Bindung zwischen den beiden Proteinen mit einer Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* verbunden ist. In den durchgeführten enzymatischen Messungen war die Galaktose-Konzentration ca. 10-fach höher als der ermittelte  $K_m$ -Wert von *K/Gal1* für Galaktose (s. Abschnitt 2.14.3), sodass davon ausgegangen werden kann, dass *K/Gal1* in den Experimenten nahezu vollständig mit Galaktose abgesättigt war (dies gilt auch für das Substrat ATP; s. Abschnitt 2.14.3). Für den  $K_{D,app}$  der Bindung zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* in Anwesenheit von Galaktose (nach dem Reaktionsschema:  $K/Gal1 + K/Gal80 \leftrightarrow K/Gal1-K/Gal80$ ) gilt somit:

$$K_{D,app} = \frac{[K/Gal1] + [K/Gal80]}{[K/Gal1-K/Gal80]} \quad (A-1)$$

Für die Gesamtkonzentration von *K/Gal1* ( $[K/Gal1_0]$ ) gilt:

$$[K/Gal1_0] = [K/Gal1] + [K/Gal1-K/Gal80] \quad (A-2)$$

Der Berechnung der relativen Glaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* in Anwesenheit von *K/Gal80* wurde folgende Formel zu Grunde gelegt:

$$\text{Relative Aktivität} = \frac{[K/Gal1] + k_1 \cdot [K/Gal1-K/Gal80]}{[K/Gal1_0]} \quad (A-3)$$

Der Faktor  $k_1$  quantifiziert hierbei die Aktivität von *K/Gal1* im *K/Gal80*-gebundenen Zustand. Durch Einsetzen der Gleichungen A-1 und A-2 in Gleichung A-3 und Umformen ergibt sich:

$$\text{Relative Aktivität} = \frac{k_1 \cdot [K/Gal80] + K_{D,app}}{K_{D,app} + [K/Gal80]} \quad (A-4)$$

Unter der Annahme, dass die Konzentration an freiem *K/Gal80* der Gesamtkonzentration an *K/Gal80* entspricht (diese Voraussetzung war in den Inhibierungsexperimenten annähernd gegeben; s. Abschnitt 3.2.1), kann diese Formel direkt zur Bestimmung des  $K_{D,app}$ -Wertes der *K/Gal1-K/Gal80*-Interaktion auf der Basis der Galaktokinase-Inhibierungsexperimente verwendet werden. Hierzu wurde diese Gleichung mit Hilfe des Programms Grace, Version 5.1.8 (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) an die Messdaten der Inhibierungsexperimente angepasst („Non-linear curve fitting“).

Die Ergebnisse der erweiterten Inhibierungsexperimente (in Anwesenheit von *K/Gal80* und *miniScGal4* bzw. *K/Gal4*-Aktivierungsdomäne) wurden mit einem einfachen Dissoziationsmodell abgebildet (s. Abb. 8). Die Schätzung der Parameter dieses Modells erfolgte durch Anpassung der Simulationsergebnisse an die experimentellen Daten unter Zuhilfenahme der Funktionen `adsmx` und `mdsmx` der „Matrix Computation Toolbox“ (N.J. Higham; <http://www.ma.man.ac.uk/~higham/mctoolbox>); dazu wurde die Summe der Abweichungsquadrate minimiert.

### 2.15.3. Berechnung der *K/Gal1*- und *K/Gal80*-Mengen innerhalb einer Zelle

Die Berechnung der Menge bzw. molaren Konzentration eines Proteins innerhalb einer Zelle bzw. eines Zellkern auf der Basis seiner Massekonzentration im Proteinrohextrakt erfolgte nach der in Anders (2000) vorgestellten Methode. Die hierfür benötigten Umrechnungsfaktoren wurden ebenfalls dieser Arbeit entnommen. Für die Masse des Proteins pro Zelle gilt:

$$m \text{ (fg)} = c \text{ (ng/}\mu\text{g)} \cdot m_{\text{Zelle}} \text{ (pg)} \cdot f$$

$m$  ... Masse des Proteins pro Zelle (fg)

$c$  ... Massekonzentration des Proteins im Rohextrakt (ng/  $\mu$ g Proteinextrakt)

$m_{\text{Zelle}}$  ... Trockenmasse einer Zelle (6,2 pg)

$f$  ... Proteinanteil einer Zelle (0,4 g Protein pro g Zelltrockenmasse)

Die Kenntnis des Molekulargewichtes des zu bestimmenden Proteins (*IHGal80*: 52,2 g/mol; *K/Gal1*:55,8 g/mol) und des Kern- bzw. Zellvolumens (2 fL Kernvolumen von *S. cerevisiae* nach Winey *et al.*, 1997 bzw. 22,6 fL Zellvolumen von *K. lactis* nach Anders 2000) ermöglicht die Berechnung der molaren Konzentration innerhalb des Kerns bzw. der Zelle. Mit Hilfe der Avogadrokonstante kann die Anzahl der Moleküle aus der Molmenge berechnet werden.

Die Angabe der Massekonzentration eines Proteins bezogen auf eine definierte Menge von OD-Einheiten (ODE) ermöglicht eine direktere Berechnung der Masse dieses Proteins innerhalb einer Zelle. Der hierzu benötigte Umrechnungsfaktor (für das verwendete Photometer Beckman DU 640) wurde ebenfalls Anders (2000) entnommen (1 ODE entspricht  $7,68 \cdot 10^7$  Zellen).

### 2.16. Analytische Gelfiltration

Die analytischen Gelfiltrationsexperimente erfolgten mit Hilfe des SMART-Systems (Pharmacia) und der Gelfiltrationssäule Superdex 200 PC 3.2/30 (Pharmacia). Sofern nicht anders angegeben, befanden sich die zu analysierenden Proteine in ihrem jeweiligen Dialysepuffer und wurden vor dem Experiment für mindestens 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Regel wurden für ein Experiment 10  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung auf die Säule, welche in dem jeweiligen Laufpuffer äquilibriert worden war, aufgetragen. Der Gelfiltrationslauf erfolgte jeweils bei 25°C mit einer Flussrate von 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Die Kalibrierung der Säule erfolgte anhand eines Standards mit Proteinen bekannten Molekulargewichts (Sigma). Die Logarithmen der Molekulargewichte der Standardproteine wurden gegen ihre Elutionsvolumina aufgetragen; durch lineare Regression mit diesen Datenpunkten wurden die apparenten Molekulargewichte der analysierten Proteine berechnet.

### 2.17. Analytische Ultrazentrifugation

Ultrazentrifugationsexperimente wurden in der analytischen Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckman) durchgeführt. Die Durchführung und quantitative Auswertung der Experimente erfolgte durch Herrn Dr. Hauke Lilie am Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

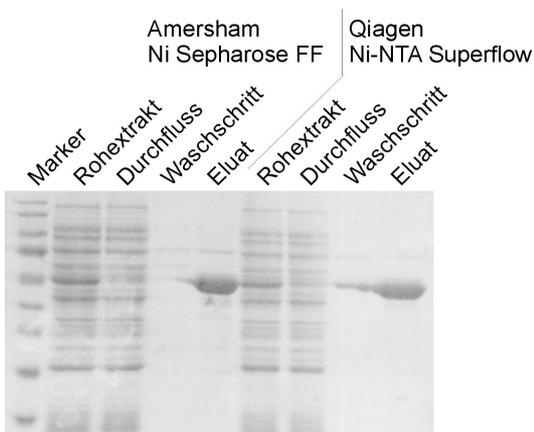
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Reinigung der Proteine *K/Gal80* und *K/Gal1*

##### 3.1.1. Optimierung der Expression und Reinigung des *K/Gal80*-Proteins

Für die während der Dissertation durchgeführten Versuche wurden große Mengen des *K/Gal80*-Proteins benötigt. Aus diesem Grund wurde die Expression dieses Proteins in *E. coli* mit dem Ziel einer möglichst hohen Ausbeute optimiert. Für die Studien stand mir ein Expressionsplasmid zur Verfügung, auf welchem ein *K/Gal80*-Fusionsprotein mit N-terminaler 6xHis-Markierung codiert ist (pETNHG80; Protein wird analog dazu als NHGal80 bezeichnet). Erste Versuche zeigten, dass eine sehr hohe Ausbeute durch Expression im Stamm Rosetta(DE3)-pLys (Novagen) erreicht werden kann. Dieser Stamm trägt zur Steigerung der Translationseffizienz eukaryotischer Proteine zusätzliche Kopien der Gene für solche tRNAs, die in *E. coli* selbst nur in geringer Menge vorhanden sind. In nachfolgenden Versuchen wurden verschiedene Expressionsbedingungen getestet, wobei das Ziel in einer Erhöhung der Ausbeute und einer Verbesserung des Verhältnisses von löslichem zu unlöslichem Protein bestand. Das im Methodenteil aufgeführte Vorgehen (s. Abschnitt 2.13.1) erwies sich dabei als besonders effizient. Dieses Protokoll ermöglicht die Gewinnung von 20-40 mg löslichem *K/Gal80*-Protein aus einem Liter Zellkultur.

Die Reinigung des Proteins erfolgte unter Ausnutzung der N-terminalen 6xHis-Markierung durch Bindung an und Elution von Ni-NTA-Sepharose. Durch die hohe Effizienz der Expression und die damit einher gehende hohe Konzentration im Protein-Rohextrakt führt bereits diese einfache Reinigungsprozedur zu einer hohen Reinheit des *K/Gal80*-Proteins (s. Abb. 2).

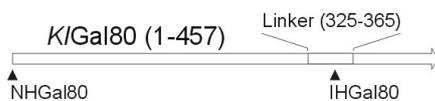


**Abbildung 2.** Reinigung des N-terminal 6xHis-markierten *K/Gal80*-Proteins (NHGal80). Expression und Reinigung erfolgten nach dem Standardprotokoll (s. Abschnitt 2.13.1). Als Säulenmaterialien dienten Amersham Ni-Sepharose Fast Flow bzw. Qiagen Ni-NTA Superflow. Jeweils 3 µl aus den Fraktionen wurden auf ein 10%-iges SDS-PAA-Gel aufgetragen, welches mit Coomassie-Blue gefärbt wurde. Die aufgetragene Menge der gereinigten Eluate entspricht jeweils ca. 9 µg Protein.

Ein Problem bei der Reinigung ergab sich aus der Tatsache, dass *K*Gal80 während vieler Präparationen stark zur Präzipitation neigte. Zum Teil wurde direkt nach Elution von der Säulenmatrix eine Trübung des Eluats beobachtet, welche kurz darauf zu einer sichtbaren Präzipitation des Proteins führte. Erste Versuche zur Kristallisation von *K*Gal80 zeigten, dass das Protein durch Zugabe von Citrat zum Puffer stabilisiert werden kann. Wie in Abschnitt 3.3.1 gezeigt werden wird, führt Citrat zur Stabilisierung einer dimeren Form von *K*Gal80.

Im Verlauf der Arbeit wurde ein weiteres Expressionsplasmid erzeugt, welches für ein *K*Gal80-Protein mit interner 6xHis-Markierung codiert (pETIHG80; entsprechend dazu Protein IHGal80). Die Markierung dieses Proteins befindet sich innerhalb der so genannten „Linker“-Region (Zenke *et al.*, 1993; s. Abb. 3). Die Tatsache, dass diese Region zwischen den ansonsten sehr stark konservierten homologen Gal80-Proteinen aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* keine Ähnlichkeit aufweist und der Befund, dass die Insertion von Fremdsequenzen in der entsprechenden Region von *Sc*Gal80 die Funktion dieses Proteins nicht beeinträchtigt (Nogi und Fukasawa, 1989), hatte dazu geführt, dass dieser Bereich von Zenke (1995) für die Insertion der Markierung ausgewählt worden war. Expression und Reinigung der Variante IHGal80 erfolgten analog zu denen des N-terminal markierten Proteins (NHGal80). In Abb. 3 sind die in den beiden verwendeten *K*Gal80-Varianten eingebrachten Modifikationen dargestellt.

**A** His-Markierungen



**B** Partielle Alignments

<i>K</i> Gal80 (1-8)	MNNNKRSK
NHGal80	<u>MGSS</u> <b>HHHHHH</b> <u>SSGLVPR</u> GSHMLEDRS-NNNKRSK
<i>K</i> Gal80 (345-360)	DKEKV-----TK <b>SP</b> SPSTGTS
IHGal80	DKEK-LRS <b>HHHHHH</b> GTKSPSPSTGTS

**Abbildung 3.** Modifikationen der 6xHis-markierten *K*Gal80-Varianten. (A) Die Positionen der 6xHis-Markierungen der beiden exprimierten und gereinigten *K*Gal80-Varianten sind durch Dreiecke markiert. Der Rahmen zeigt die Position des „Linkers“ an (s. Text). (B) Partielle Alignments des *K*Gal80-Wildtypproteins mit den 6xHis-markierten *K*Gal80-Varianten. Dargestellt sind jeweils die Bereiche, welche in den veränderten Varianten die 6xHis-Markierung (fett) tragen. Die nicht dargestellten Sequenzen sind jeweils identisch. Die in der Sequenz der Variante NHGal80 enthaltene Thrombin-Erkennungsstelle ist unterstrichen, die durch Thrombin-Behandlung abspaltbare Sequenz ist grau unterlegt. Die markierten Serin-Reste werden *in vivo* reguliert phosphoryliert (Kapp *et al.*, unveröffentlicht).

### 3.1.2. Expression und Reinigung des *K/Gal1*-Proteins

Die Reinigung des *K/Gal1*-Proteins erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen. Zur Expression in *K. lactis* stand das Plasmid pGstGal1 (Zenke *et al.*, 1999) zur Verfügung, welches für ein Glutathion-S-transferase- (Gst-) *K/Gal1*-Fusionsprotein (GstGal1) codiert. Die Reinigung dieser Variante erfolgte mit Hilfe von Glutathion-Sepharose (s. Abschnitt 2.13.2.1). Zur Untersuchung des Multimerisierungsverhaltens von *K/Gal1* war diese Variante jedoch ungeeignet, da Gst selbst zur Dimerisierung befähigt ist (s. z.B. Maru *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde ein Plasmid zur bakteriellen Expression eines N-terminal 6xHis-markierten *K/Gal1*-Proteins konstruiert (pETNHG1; Protein analog dazu NHGal1), dessen Reinigung mit Hilfe von Ni-NTA-Sepharose erfolgte (s. Abschnitt 2.13.2.2). Die enzymatische Aktivität dieses bakteriell exprimierten *K/Gal1*-Proteins (ca. 72 U/mg entspricht  $k_{\text{cat}} \approx 70 \text{ s}^{-1}$  bei 58,0 kDa) ist vergleichbar mit der des Gst-markierten, in *K. lactis* exprimierten Proteins (ca. 46 U/mg entspricht  $k_{\text{cat}} \approx 63 \text{ s}^{-1}$  bei 82,8 kDa). Die Affinitäten beider Proteinvarianten zu *K/Gal80* wurden mittels des im nächsten Abschnitt vorgestellten Inhibierungsexperimentes ermittelt, wobei auch hier kein signifikanter Unterschied feststellbar war.

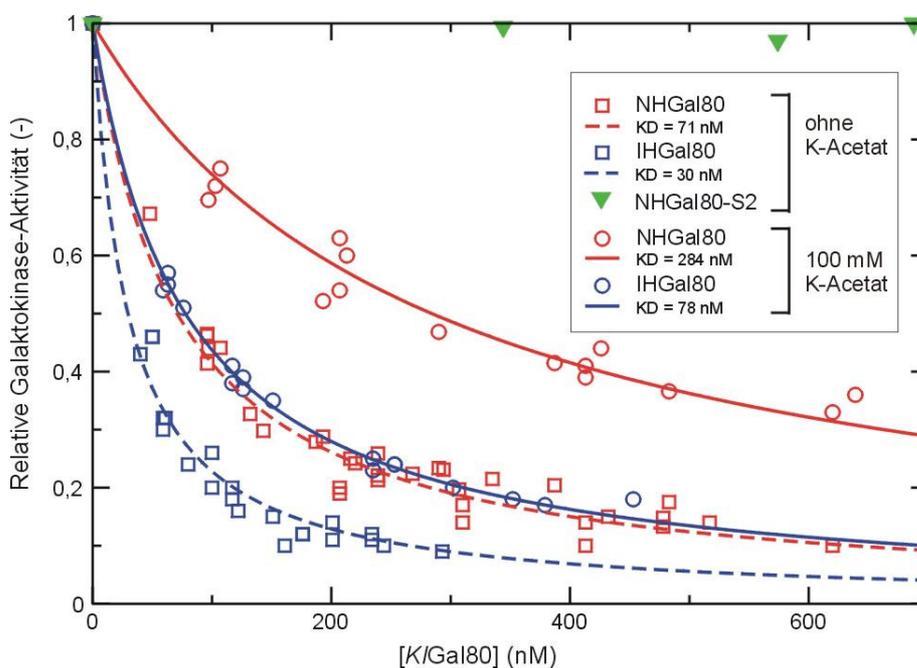
## 3.2. Bestimmung der Interaktionsparameter zwischen den Regulatoren

### 3.2.1. Die Bindung zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* führt zur Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1*

In vorangegangenen Arbeiten ist gezeigt worden, dass *K/Gal1* in Abhängigkeit von Galaktose und ATP an *K/Gal80* bindet (Zenke *et al.*, 1996). *K/Gal1* selbst ist eine Galaktokinase, katalysiert also die Umsetzung jener Substrate, welche die Bindung an *K/Gal80* verstärken. Infolgedessen sollte die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen sehr transient sein für den Fall, dass die enzymatische Aktivität von *K/Gal1* nicht beeinflusst würde. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass die Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* eine Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* beinhaltet.

Zum Testen dieser Hypothese wurde die Galaktokinase-Aktivität von gereinigtem *K/Gal1* in Gegenwart von *K/Gal80* gemessen (zum Vorgehen s. Abschnitt 2.14.3). Mit Hilfe dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von *K/Gal80* konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* führt (s. Abb. 4). Um zu zeigen, dass die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* auf der Bindung an *K/Gal80* beruht, wurde als Kontrolle eine *K/Gal80*-Variante (NHGal80-S2) verwendet, welche

auf Grund einer Punktmutation nicht zur Interaktion mit *K/Gal1* befähigt ist (Zenke *et al.*, 1999). In Übereinstimmung mit der Annahme hat diese *K/Gal80*-Variante keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von *K/Gal1* (s. Abb. 4). Die qualitative Korrelation zwischen der Fähigkeit einer *K/Gal80*-Variante zur Bindung an *K/Gal1* und ihrer Fähigkeit zur Inhibierung der enzymatischen Aktivität legt nahe, dass es eine quantitative Korrelation zwischen der Stärke der inhibitorischen Aktivität von *K/Gal80* und der Stärke der Bindung an *K/Gal1* gibt. Das wiederum eröffnet die Möglichkeit, mit Hilfe des Inhibierungsexperimentes die Affinität zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* in Anwesenheit von Galaktose und ATP zu bestimmen.



**Abbildung 4.** Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* durch *K/Gal80*. Die Messungen erfolgten wie unter 2.14.3 beschrieben mit gereinigtem Gst-markierten *K/Gal1*. Die Experimente wurden mit den beiden *K/Gal80*-Varianten NHGal80 (rot) und IHGal80 (blau) jeweils unter Niedrig- und Hochsalzbedingungen (Quadrate bzw. Kreise) durchgeführt, woraus vier Datensätze resultieren. Hier abgebildet sind die Ergebnisse aus jeweils mindestens drei unabhängigen Messungen, die Messwerte zur Variante NHGal80-S2 (grüne Dreiecke) entstammen einem Experiment. Man beachte, dass diese Variante nicht an *K/Gal1* binden kann (s. Text). Die Kurven stellen Anpassungen an die Messwerte dar ( $\text{Rel. Akt.} = K_{D,app} / (K_{D,app} + [K/Gal80]_0)$ ); s. dazu Text), wobei die Anpassungen jeweils für alle Messwerte eines Datensatzes gemeinsam erfolgten. Die entsprechenden  $K_{D,app}$ -Werte (KD) sind in der Legende aufgeführt.

In Hinsicht auf die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der Interaktion ( $K_{D,app}$ ) zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* muss sichergestellt sein, dass die Galaktokinase-Aktivitätsmessungen tatsächlich das Gleichgewicht der Interaktion zwischen den beiden Proteinen widerspiegeln. Das war, soweit feststellbar, der Fall. Die Zeit der Präinkubation von *K/Gal80* mit *K/Gal1* im Messansatz vor dem Starten der Reaktion durch Zugabe von Galaktose hatte keinen Einfluss auf die Galaktokinase-Aktivität. Auch wurde in einzelnen Versuchen die Reaktion über

einen Zeitraum von 10-15 min verfolgt, wobei in dieser Zeitspanne keine signifikante Veränderung der enzymatischen Aktivität festgestellt werden konnte. Dies legt den Schluss nahe, dass sich das Gleichgewicht der Interaktion zwischen den beiden Proteinen schnell einstellt und somit tatsächlich von den Messungen erfasst wird.

Zur Ermittlung der Affinität zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* wurde folgende Gleichung an die Messwerte angepasst (s. auch Methoden Abschnitt 2.15.2):

$$\text{Relative Aktivität} = \frac{k1 \cdot [K/Gal80_0] + K_{D,app}}{K_{D,app} \cdot [K/Gal80_0]}$$

Bei der Herleitung dieser Gleichung wurde vorausgesetzt, dass die Konzentration von freiem *K/Gal80* der Gesamtkonzentration an *K/Gal80* ( $[K/Gal80_0]$ ) entspricht. Diese Voraussetzung war in den Inhibierungsexperimenten annähernd gegeben, da *K/Gal80* jeweils in einem Überschuss im Vergleich zu *K/Gal1* (jeweils ca. 10 nM; s. Methoden 2.14.3) eingesetzt wurde. Der Faktor  $k1$  in der Gleichung beschreibt die Restaktivität von *K/Gal1*, welche möglicherweise im *K/Gal80*-gebundenen Komplex vorhanden ist. In den jeweils mit der Formel angepassten Einzelerperimenten liegt dieser Faktor bei maximal 0,05 (entspricht max. 5% Restaktivität), ist also vernachlässigbar. Die in Abb. 4 und Tab. 1 aufgeführten  $K_D$ -Werte und Inhibierungs- bzw. Bindungskurven beruhen auf der Anpassung mit der vereinfachten Variante der Gleichung, in welcher  $k1 = 0$  gesetzt wurde.

Festzuhalten bleibt somit, dass die Bindung von *K/Gal80* an *K/Gal1* zu einer vollständigen Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* führt. Diese Tatsache ermöglicht die Bestimmung der Affinität zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80*.

### 3.2.2. Die beiden verwendeten *K/Gal80*-Varianten besitzen unterschiedliche Affinitäten zu *K/Gal1*

Wie eingangs erwähnt, wurden während der Arbeit zwei an verschiedenen Positionen 6xHis-markierte *K/Gal80*-Varianten bakteriell exprimiert und gereinigt (s. Abb. 3). Beide Varianten wurden in dem oben geschilderten Inhibierungsexperiment verwendet. Die Experimente wurden jeweils unter Niedrig- und Hochsalzbedingungen (ohne bzw. 100 mM K-Acetat) durchgeführt. Wie in Abb. 4 zu erkennen ist, unterscheiden sich die beiden *K/Gal80*-Varianten in ihrer Effizienz, die Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* zu inhibieren. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass beide Varianten unterschiedliche Affinitäten zu *K/Gal1* besitzen. Die N-terminal 6xHis-markierte Variante (NHGal80) hat unter beiden getesteten

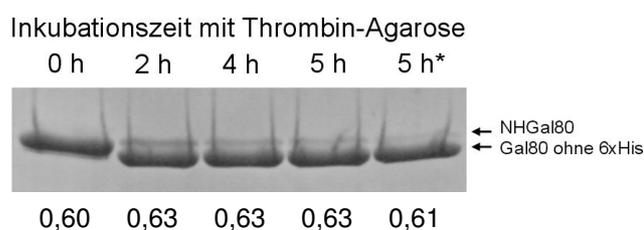
Bedingungen (mit und ohne K-Acetat) eine niedrigere Affinität zu *K/Gal1*. Die Unterschiede in den Affinitäten sind relativ gering (ca. Faktor 2,5-3,5), waren aber reproduzierbar in allen parallel durchgeführten Experimenten. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

**Tabelle 1.** Affinitäten zwischen *K/Gal1* und verschiedenen *K/Gal80* Varianten.

<i>K/Gal80</i> -Variante	$K_{D,app}$ * (ohne K-Acetat)	$K_{D,app}$ * (100 mM K-Acetat)
IHGal80	30 nM	83 nM
NHGal80	75 nM	292 nM
NHGal8031 <sup>#</sup>	170 nM <sup>§</sup>	nicht ermittelt

\* Die Werte wurden mit Hilfe der Galaktokinase-Inhibierungsexperimente ermittelt und stellen Mittelwerte der  $K_{D,app}$  aus jeweils mindestens drei verschiedenen Experimenten dar. Die Standardabweichungen betragen jeweils weniger als 30%.<sup>#</sup> Diese Variante ist nicht zur Interaktion mit *K/Gal4* befähigt (Zenke *et al.*, 1999).<sup>§</sup> Diese Messung wurde nur einmal systematisch zur Bestimmung des  $K_{D,app}$  durchgeführt; auch in allen weiteren Einzelmessungen war deutlich, dass die Affinität jeweils geringer war als jene von NHGal80.

Die Variante NHGal80 besitzt im N-Terminus eine Erkennungsstelle für Thrombin (s. Abb. 3), was die spezifische Abspaltung der His-Markierung durch diese Protease ermöglicht. Die mit Hilfe von Thrombin vorgenommene Entfernung der N-terminalen His-Markierung von NHGal80 bewirkt keine signifikante Verbesserung seiner Fähigkeit zur Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* (s. Abb. 5). Demnach beruht die geringere Affinität zu *K/Gal1* (im Vergleich zu IHGal80) nicht auf der His-Markierung selbst. Jedoch führt die Abspaltung des N-Terminus nicht zur vollständigen Entfernung der im Vergleich zum Wildtypprotein zusätzlichen Sequenz (s. Abb. 3). Möglicherweise beeinflussen die verbleibenden zusätzlichen Reste die Affinität zu *K/Gal1*.



**Abbildung 5.** Einfluss der N-terminalen His-Markierung von NHGal80 auf die Affinität zu *K/Gal1*. NHGal80 wurde in Spaltbuffer (70 mM Tris/HCl pH8,0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM Na-Citrat) bei 4 °C mit Thrombin-Agarose (Sigma) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der Ansatz abzentrifugiert und (Gal80-haltiger) Überstand entnommen. Die verschiedenen Fraktionen wurden durch SDS-PAA-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Blue-Färbung analysiert. Jeweils gleiche Mengen dieser Fraktionen im Galaktokinase-Inhibierungsexperiment eingesetzt. Die relativen Galaktokinase-Aktivitäten von *K/Gal1* nach Zugabe der entsprechenden Gal80-haltigen Fraktionen sind unter der Abbildung angegeben. \*Diese Fraktion wurde zusätzlich für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

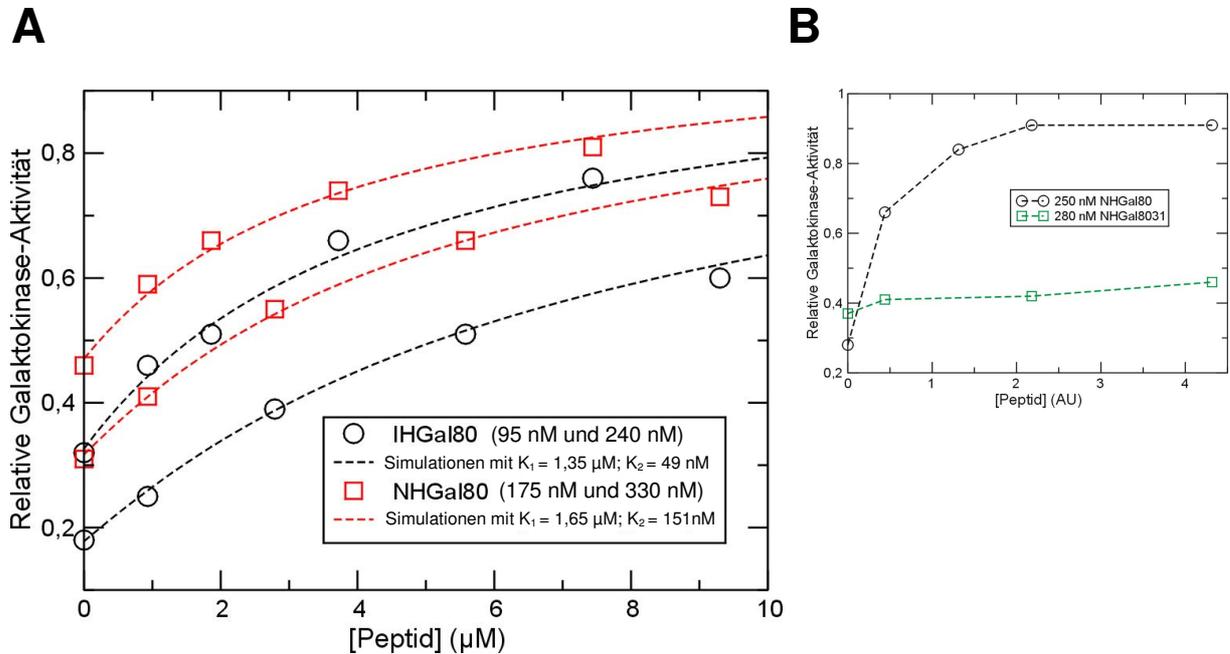
Die verschiedenen Fraktionen wurden durch SDS-PAA-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Blue-Färbung analysiert. Jeweils gleiche Mengen dieser Fraktionen im Galaktokinase-Inhibierungsexperiment eingesetzt. Die relativen Galaktokinase-Aktivitäten von *K/Gal1* nach Zugabe der entsprechenden Gal80-haltigen Fraktionen sind unter der Abbildung angegeben. \*Diese Fraktion wurde zusätzlich für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.2.3. Die Aktivierungsdomäne von *KIGal4* kompetiert gegen die Inhibierung

Wie in der Einleitung dargelegt wurde, ist der Galaktose-Schalter zwischen den beiden Hefen *K. lactis* und *S. cerevisiae* stark konserviert. Der Schalter besteht jeweils aus den drei Komponenten Gal4, Gal80 und Gal1 (bzw. Gal3 in *S. cerevisiae*). Neben der Interaktion mit Gal1 (Gal3) bindet Gal80 an den Transkriptionsaktivator Gal4. Die Bindung von Gal80 an die Aktivierungsdomäne (AD) von Gal4 führt zur Inhibierung ihrer transkriptionsstimulierenden Aktivität. Die Aktivierung von Gal4 im Zuge der Galaktose-Induktion erfolgt durch Bindung zwischen Gal1 (bzw. Gal3) und Gal80 (Zenke *et al.*, 1996; Suzuki-Fujimoto *et al.*, 1996; Yano und Fukasawa, 1997). Der Mechanismus, welcher dieser Aktivierung zu Grunde liegt, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt. Untersuchungen zu dessen Aufklärung, welche vorrangig in *S. cerevisiae* durchgeführt wurden, führten zur Postulierung verschiedener Modelle (s. dazu Einleitung). Unabhängig von den jeweiligen vorgeschlagenen Mechanismen besitzen die Modelle die Gemeinsamkeit, dass sie zur Aktivierung des Schalters eine durch die Gal3-Gal80-Bindung verstärkte Freisetzung der AD von Gal4 fordern, also eine Abschwächung der Interaktion zwischen Gal4-AD und Gal80. Dies impliziert, dass sich die Bindungen von Gal80 mit der Gal4-Aktivierungsdomäne einerseits und Gal3 (bzw. *KIGal1*) andererseits gegenseitig abschwächen. Mit anderen Worten ausgedrückt fordern alle publizierten (mir bekannten) Modelle, dass Gal3 (bzw. *KIGal1*) gegen die Bindung zwischen Gal4-AD und Gal80 kompetiert (was eine allosterische Transformation von Gal80 beinhalten kann, aber nicht muss). In diesem Sinne sind also sämtliche Modelle kompetitive Modelle. Bei Annahme der Reversibilität der dabei beteiligten Prozesse bedeutet dies, dass die Gal4-AD gegen die Bindung zwischen Gal3 (bzw. *KIGal1*) und Gal80 kompetieren muss. Diese Prädiktion lässt sich für die Regulatoren aus *K. lactis* mit Hilfe des in dieser Arbeit vorgestellten Galaktokinase-Inhibierungsexperimentes testen. Wie in Abschnitt 3.2.1 dargelegt wurde, kann mit diesem Experiment die Interaktion zwischen *KIGal1* und *KIGal80* detektiert und quantifiziert werden. Diese Messung beruht auf der Tatsache, dass die Bindung zwischen beiden Proteinen eine Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *KIGal1* bewirkt. Unter der oben formulierten Hypothese, welche besagt, dass die Aktivierungsdomäne von *KIGal4* gegen die Bindung zwischen *KIGal1* und *KIGal80* kompetiert, sollte somit erwartet werden, dass die Aktivierungsdomäne der *KIGal80*-abhängigen Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *KIGal1* entgegenwirkt.

Zum Testen dieser Hypothese wurde in den Inhibierungsexperimenten ein chemisch synthetisiertes Peptid benutzt, welches aus den 22 C-terminalen Aminosäuren (844-865) von *KIGal4* besteht (s. Abschnitt 2.6). Diese Sequenz ist hoch konserviert zwischen den beiden homologen Gal4-Proteinen aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* (Aminosäuren 852-873) und enthält den Bereich innerhalb der Aktivierungsdomäne, welcher von *KIGal80* bzw. *ScGal80* ge-

bunden wird (Johnston *et al.*, 1987; Ma und Ptashne, 1987b; Salmeron *et al.*, 1989, Wu *et al.*, 1996).



**Abbildung 6.** Einfluss der Aktivierungsdomäne von *KGal4* auf die *KGal80*-abhängige Inhibierung der *KGal1*-Aktivität. Die Messungen erfolgten wie unter 2.14.3 beschrieben mit gereinigtem Gst-markierten *KGal1* unter Niedrigsalzbedingungen (ohne K-Acetat im Messpuffer) in Anwesenheit von 0,5 mM EDTA. Das verwendete synthetische Peptid besteht aus den 22 C-terminalen Aminosäuren von *KGal4* (s. Text). (A) Konkurrenz des Peptids gegen die Inhibierung. Die Experimente wurden unter Verwendung der *KGal80*-Varianten IHGal80 (schwarze Kreise; auf der oberen Kurve liegende Messwerte mit jeweils 95 nM, untere Kurve mit jeweils 240 nM) und NHGal80 (rote Quadrate; obere Kurve jeweils 175 nM, untere Kurve jeweils 330 nM) durchgeführt. Zu den Reaktionsansätzen mit konstanter Menge an *KGal80* wurden jeweils verschiedene Mengen des synthetischen Peptids zugegeben, die resultierende relative Galaktokinase-Aktivität (bezogen auf Ansatz ohne *KGal80* und Peptid) in den Ansätzen wurde in Abhängigkeit von der Peptid-Konzentration aufgetragen. Gestrichelte Linien zeigen Simulationen auf der Basis eines Dissoziationsmodells (s. Abschnitt 3.2.5). Die dafür verwendeten Parameterwerte ( $K_{D,app}$ -Werte; Bezeichnung entsprechend Abb. 8) sind in der Legende angegeben. (B) Die Konkurrenz des synthetischen Peptids beruht auf spezifischer Bindung an *KGal80*. Die Konzentrationen des Peptides wurden in diesem Experiment nicht absolut quantifiziert und sind daher in willkürlichen relativen Einheiten (AU) angegeben. Die Variante NHGal8031 (grüne Quadrate) ist nicht zur Interaktion mit *KGal4* befähigt (Zenke *et al.*, 1999). Die gestrichelten Linien stellen lediglich Verbindungen zwischen den Messpunkten dar.

Die entsprechenden Inhibierungsexperimente wurden mit beiden gereinigten *KGal80*-Varianten (IHGal80 und NHGal80) durchgeführt. Zu einer jeweils konstanten Menge an *KGal80* in den Inhibierungsansätzen wurden steigende Mengen des Peptids zugegeben. In Abbildung 6 sind die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt. In Übereinstimmung mit der Hypothese konnte festgestellt werden, dass die Zugabe des Peptids zu einem Gemisch aus *KGal1* und *KGal80* konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Galaktokinase-Aktivität führt (Abb. 6A). Der durch die beiden *KGal80*-Varianten IHGal80 und NHGal80 bedingten Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *KGal1* kann also durch Zugabe des Peptids

entgegengewirkt werden. Der Effekt des Peptids beruht auf dessen Interaktion mit *K/Gal80*. Gezeigt wird dies durch die Tatsache, dass das Peptid keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität der Variante *NHGal8031* hat (s. Abb. 6B), welche auf Grund einer Punktmutation nicht zur Bindung an *K/Gal4* befähigt ist (Zenke *et al.*, 1999).

Unter der Annahme, dass enzymatisch aktives *K/Gal1* mit freiem (nicht an *K/Gal80* gebundenem) *K/Gal1* gleichzusetzen ist, folgt aus diesen Experimenten, dass *K/Gal1* und die Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* um die Bindung an *K/Gal80* kompetieren. Bewirkt die Bindung der Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* an *K/Gal80* eine verstärkte Freisetzung von *K/Gal1*, so bedeutet dies im Umkehrschluss (bei Annahme der Reversibilität der Prozesse), dass die Bindung zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* zur verstärkten Freisetzung der Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* führt. Die einfachste Erklärung für die hier gezeigten Ergebnisse besteht in der Annahme einer direkten Competition zwischen *K/Gal1* und der Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* um die Bindung an *K/Gal80*. In Abschnitt 3.2.5 wird gezeigt, dass sich die Ergebnisse dieses Experimentes durch ein Gleichgewichtsmodell auf der Basis eines reinen Dissoziationsmodells abbilden lassen.

#### 3.2.4. miniScGal4 hebt die Inhibierung vollständig auf

Mit dem im vorangegangenen Abschnitt vorgestellten Experiment konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* gegen die *K/Gal80*-abhängige Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* kompetiert. Auffällig dabei ist, dass diese Competition relativ schwach ist, dass also ein großer Überschuss des Peptides gegenüber *K/Gal80* benötigt wird, um der Inhibierung entgegenzuwirken (s. Abb. 6). Legt man bei der Interpretation der Ergebnisse ein auf direkter Competition beruhendes Modell zu Grunde, muss aus diesem Experiment der Schluss gezogen werden, dass die Interaktion zwischen *K/Gal80* und der Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* relativ schwach im Vergleich zur *K/Gal1-K/Gal80*-Interaktion ist. Experimente zur Bestimmung der apparenten Affinität zwischen ScGal4 und ScGal80 offenbarten jedoch eine sehr hohe Affinität zwischen diesen beiden Proteinen (0,3 nM; Melcher und Xu, 2001).

Es wurde beschrieben, dass Gal4 und Gal80 aus *S. cerevisiae* in jeweils dimerer Form miteinander interagieren (Melcher und Xu, 2001). Ein Mechanismus zur Steigerung der apparenten Affinität der Gal4-Gal80-Interaktion könnte somit in der kooperativen Bindung der beiden Dimere bestehen. Das in den Inhibierungsexperimenten verwendete Peptid besitzt keine Dimerisierungsdomäne und könnte demnach lediglich nicht-kooperativ an *K/Gal80* binden. Eine Gal4-Variante, welche im Gegensatz zum Peptid zur Dimerisierung befähigt ist, sollte

demzufolge der durch *K/Gal80* verursachten Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* wesentlich stärker entgegenwirken können.

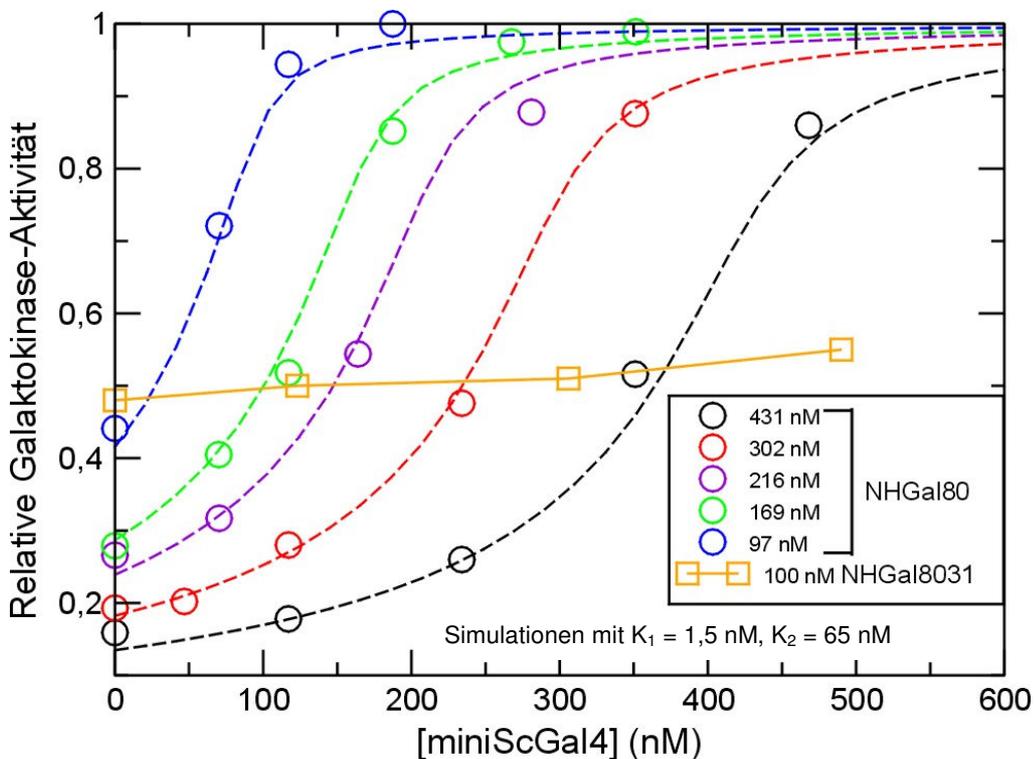
Zum Testen dieser Hypothese wurde eine MiniGal4-Variante (*miniScGal4*) herangezogen, welche aus dem Gal4-Protein aus *S. cerevisiae* abgeleitet wurde (Wu *et al.*, 1996). Diese enthält DNA-Binde-, Dimerisierungs- und Aktivierungsdomäne (Aminosäuren 1-100+840-881) und wird in *S. cerevisiae in vivo* ähnlich reguliert wie das Volllängen-Protein (Wu *et al.*, 1996).

Wird dieses gereinigte Protein im Inhibierungsexperiment zu einem Gemisch aus *K/Gal1* und *K/Gal80* gegeben, so führt dies (wie mit dem Peptid) konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Galaktokinase-Aktivität. In Abbildung 7 sind die Ergebnisse dieser Versuche mit der *K/Gal80*-Variante *NHGal80* gezeigt; die Verwendung von *IHGal80* führte zu sehr ähnlichen Resultaten (Daten nicht gezeigt). Die inhibitorische Aktivität der Variante *NHGal8031*, welche nicht zur Bindung an *K/Gal4* befähigt ist, wird durch *miniScGal4* nicht beeinflusst (s. Abb. 7). Dies zeigt wiederum, dass die Aufhebung der Inhibierung auf der spezifischen Interaktion zwischen *K/Gal80* und *miniScGal4* beruht.

Bei einem Vergleich der Versuche zur Aufhebung der Inhibierung mit dem synthetischen Peptid (*K/Gal4-AD*) und *miniScGal4* (vgl. Abb. 6 und 7) wird deutlich, dass *miniScGal4* in dieser Hinsicht, in Übereinstimmung mit der oben formulierten Hypothese, wesentlich effizienter ist als das Peptid. Dies legt den Schluss nahe, dass *miniScGal4* eine höhere apparente Affinität zu *K/Gal80* besitzt als das synthetische Peptid (*K/Gal4-AD*).

Von Sil *et al.* (1999) ist gezeigt worden, dass *ScGal80* neben der Bindung an die Gal4-AD eine Zweihybrid-Interaktion mit einem Bereich von *ScGal4* (Aminosäuren 225-797) eingehen kann, welcher sich außerhalb der AD befindet. In der hier verwendeten *miniScGal4*-Variante ist diese Sequenz nicht enthalten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hier gezeigte sehr effiziente Aufhebung der Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität durch dieses Protein auf einer Interaktion zwischen *K/Gal80* und der Aktivierungsdomäne von *miniScGal4* beruht. Die Sequenz innerhalb der AD von *ScGal4*, welche zur Bindung an *ScGal80* benötigt wird (Johnston *et al.*, 1987; Ma und Ptashne, 1987b; Wu *et al.*, 1996), ist hoch konserviert zwischen den beiden Homologen *ScGal4* und *K/Gal4* (16 von 18 Aminosäuren sind identisch). Dieser konservierte Bereich aus *K/Gal4* ist in dem zuvor verwendeten synthetischen Peptid (s. voriger Abschnitt) enthalten. Punktmutationen innerhalb dieser Region von *ScGal4*, welche in *S. cerevisiae* eine konstitutive Expression der *GAL*-Gene bewirken (also einen Verlust der Fähigkeit zur Bindung an *ScGal80*), führen bei Einbringung in *K/Gal4* zu einem ähnlichen Phänotyp in *K. lactis* (Dickson *et al.*, 1990). Ein Fusionsprotein, in welchem diese konservierte Sequenz in *ScGal4* durch jene von *K/Gal4* ersetzt wurde, wird *in vivo* in *S. cerevisiae* ähnlich reguliert wie das *ScGal4*-Wildtypprotein (Salmeron *et al.*, 1989). Diese Daten legen nahe, dass die unterschiedlichen Affinitäten von *miniScGal4* und synthetischem

Peptid zu *K/Gal80* nicht auf Sequenzunterschieden beruhen, welche zwischen dem Peptid und dem entsprechenden homologen Bereich aus *ScGal4* bestehen. Vielmehr könnte eine Ursache für die Affinitätsunterschiede (wie eingangs erläutert) in der Unfähigkeit des Peptids zur Dimerisierung liegen. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass das Protein *Gst-K/Gal4-AD* (Zenke *et al.*, 1999), eine Fusion aus Glutathion S-Transferase (*Gst*) und den 25 C-terminalen Aminosäuren von *K/Gal4* (zur Erinnerung: das Peptid besteht aus den 22 C-terminalen Aminosäuren), in Hinsicht auf die Aufhebung der Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität wesentlich effizienter ist als das synthetische Peptid (Daten nicht gezeigt). *Gst* selbst besitzt die Fähigkeit zur Dimerisierung (s. z.B. Maru *et al.*, 1996) und könnte somit eine kooperative Bindung des Fusionsproteins an *K/Gal80* ermöglichen.



**Abbildung 7.** Aufhebung der *K/Gal80*-abhängigen Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* durch *miniScGal4*. Die Messungen erfolgten wie unter 2.14.3 beschrieben mit gereinigtem *Gst*-markiertem *K/Gal1* unter Niedrigsalzbedingungen (ohne *K*-Acetat im Messpuffer). Die durch Kreise dargestellten Messwerte entstammen einer Messung mit der *K/Gal80*-Variante *NHGal80*. Gleiche Farben kennzeichnen gleiche Konzentrationen an *NHGal80* in den Reaktionsansätzen. Zu diesen Reaktionsansätzen wurden jeweils verschiedene Mengen an gereinigtem *miniScGal4* (Aminosäuren 1-100+840-881) zugegeben. Die Ergebnisse eines entsprechenden Experimentes mit der Variante *NHGal8031*, welche nicht zur Bindung an *K/Gal4* befähigt ist, sind durch Quadrate dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen Simulationen der Experimente auf der Basis eines reinen Dissoziationsmodells (s. dazu Abschnitt 3.2.5). Die dabei verwendeten Parameterwerte ( $K_{D,app}$ -Werte; Bezeichnung der Parameter entsprechend Abbildung 8) sind im Diagramm aufgeführt.

Zusammengenommen legen die hier vorgestellten Ergebnisse den Schluss nahe, dass die (im Vergleich zum synthetischen Peptid) hohe Effizienz von miniScGal4 zur Aufhebung der Inhibierung der Galaktokinase-Aktivität unter anderem auf der kooperativen Bindung zwischen den dimeren Formen von miniScGal4 und *K/Gal80* beruht. Insofern deuten diese Ergebnisse implizit darauf hin, dass *K/Gal80*, ebenso wie *ScGal80*, zur Dimerisierung befähigt ist (in Abschnitt 3.3.1 wird dies explizit gezeigt).

Eine weitere wichtige Erkenntnis aus den hier vorgestellten Ergebnissen resultiert aus der Tatsache, dass durch entsprechend hohe Konzentrationen von miniScGal4 eine vollständige Aufhebung der Inhibierung erreicht werden kann (s. Abb. 7). Dies deutet darauf hin (wiederum unter der Annahme, dass enzymatisch aktives *K/Gal1* ungebundenem *K/Gal1* entspricht), dass sich die Bindungen zwischen *K/Gal80* und *K/Gal1* einerseits bzw. *K/Gal80* und miniScGal4-AD andererseits gegenseitig nicht nur abschwächen, sondern untereinander ausschließen. Entsprechend kann im nächsten Abschnitt gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse der hier vorgestellten Experimente mathematisch durch ein reines Dissoziationsmodell beschreiben lassen.

### 3.2.5. Die Ergebnisse der Inhibierungs-Experimente sind vollständig kompatibel mit einem reinen Dissoziationsmodell

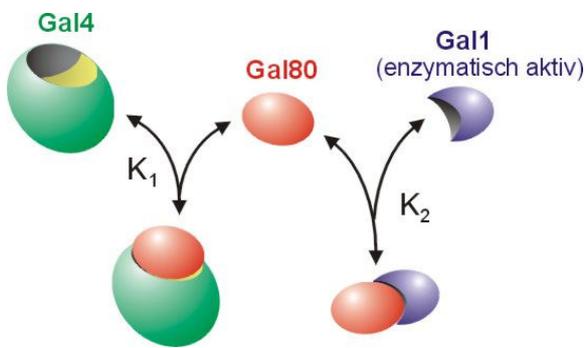
Durch die in den letzten Abschnitten vorgestellten Experimente konnte gezeigt werden, dass *K/Gal1* und die Aktivierungsdomäne von Gal4 (*K/Gal4-AD* und *ScGal4-AD*) um die Bindung an *K/Gal80* konkurrieren. Die im vorigen Abschnitt gezeigten Ergebnisse legen zudem den Schluss nahe, dass die Bindungen zwischen *K/Gal80* und Gal4-AD bzw. *K/Gal80* und *K/Gal1* sich gegenseitig ausschließen.

Die einfachste Erklärung dieser Ergebnisse besteht in der Annahme eines auf direkter Konkurrenz beruhenden reinen Dissoziationsmodells. Trifft diese Annahme zu, so sollten sich die Ergebnisse der Inhibierungsexperimente auf der Basis eines solchen Modells auch mathematisch abbilden lassen. Gelingt dies, so wäre es zudem möglich, auf der Basis des mathematischen Modells die  $K_{D,app}$ -Werte der Bindung von *K/Gal80* an miniScGal4 bzw. das synthetische Peptid (*K/Gal4-AD*) zu bestimmen (neben der bereits erfolgten Bestimmung der apparenten Affinität zwischen *K/Gal80* und *K/Gal1*). Dieser Versuch wurde im Verlauf der Arbeit unternommen und wird im Folgenden vorgestellt.

Das zur Beschreibung des *in-vitro*-Systems (Galaktokinase-Inhibierungsexperiment) eingesetzte mathematische Modell basiert auf dem einfachsten vorstellbaren reinen Dissoziations-

modell (s. Abb. 8). Da die Inhibierungsmessungen in Hinsicht auf die Interaktionen der Regulatoren Gleichgewichtsmessungen darstellen, wurde zur Beschreibung ein mathematisches Gleichgewichtsmodell eingesetzt. Das Modell enthält die drei Proteine Gal1, Gal80 und Gal4. Gemäß dem reinen Dissoziationsmodell wurde angenommen, dass Gal80 ausschließlich Gal1 oder Gal4 bindet. Die relative Galaktokinase-Aktivität wurde als der Anteil an freiem Gal1 oder Gal4 berechnet. Die Parameter des Modells sind die apparenten  $K_D$ -Werte für die Interaktionen zwischen Gal1 und Gal80 bzw. Gal80 und Gal4.

### A Schematische Darstellung



### B Gleichungen

$$G4G80 = G4 \cdot G80 / K_1$$

$$G1G80 = G1 \cdot G80 / K_2$$

Massebilanzen:

$$G4_0 = G4 + G4G80$$

$$G80_0 = G80 + G4G80 + G1G80$$

$$G1_0 = G1 + G1G80$$

**Abbildung 8.** Das einfache Dissoziationsmodell. (A) Schematische Darstellung des Modells. Abgebildet sind die in dem Modell formulierten Spezies und deren Interaktionen mit den entsprechend verwendeten Gleichgewichtskonstanten. (B) Gleichungen des mathematischen Modells. Die Bezeichnungen der Parameter (Gleichgewichtskonstanten) entsprechen den unter (A) verwendeten.  $G4_0$ ,  $G80_0$  und  $G1_0$  bezeichnen die Gesamtkonzentrationen von Gal4, Gal80 und Gal1.

Unter Benutzung von miniScGal4 wurden vier unterschiedliche Datensätze experimentell ermittelt. Diese ergaben sich durch die Verwendung beider  $K$ /Gal80-Varianten (NHGal80 und IHGal80) jeweils unter Niedrig- und Hochsalzbedingungen (0 bzw. 100 mM K-Acetat). Die Parameteroptimierung (Anpassung des Modells an die experimentellen Daten durch simultane Schätzung der Parameter; s. Methoden unter Abschnitt 2.15.2) erfolgte für die vier Datensätze unabhängig. In Abb. 7 sind die Simulationsergebnisse mit den angepassten Parametern für einen Datensatz (NHGal80 unter Niedrigsalzbedingungen) dargestellt. Es wird deutlich, dass das Modell die experimentellen Daten sehr gut reproduzieren kann. Auch für die nicht dargestellten Datensätze ist das der Fall.

Die mit Hilfe des mathematischen Modells ermittelten  $K_{D,app}$ -Werte für die Interaktion zwischen miniScGal4 und den  $K$ /Gal80-Varianten lagen für alle Datensätze zwischen 0,5 und 2,5 nM. Dieser Wert stimmt gut mit bereits veröffentlichten Angaben zur Bindung zwischen ScGal80 und (mini)ScGal4 überein (0,3 nM; Melcher und Xu, 2001). Die Affinität von  $K$ /Gal80

zu miniScGal4 ist also deutlich höher als die zu *K/Gal1*, in den Einzelexperimenten jeweils mindestens um den Faktor 20. Es konnte in Hinsicht auf die Affinität zu miniScGal4 kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden *K/Gal80*-Varianten (und der An- oder Abwesenheit von K-Acetat) festgestellt werden. An dieser Stelle möchte ich jedoch anmerken, dass mit der hier vorgestellten Methode in diesem Bereich sehr niedriger  $K_D$ -Werte (ca. unter 3 nM) nur eingeschränkt Unterschiede ermittelbar sind. Dies beruht auf der Tatsache, dass die apparente Affinität der *K/Gal80*-miniScGal4-Interaktion wesentlich höher ist als jene der *K/Gal80*-*K/Gal1*-Bindung. Daraus resultiert ein sehr steiler Verlauf der Bindungskurve, wodurch kleine experimentelle Fehler einen sehr starken Einfluss auf die Messwerte haben. Aus diesem Grund wird hier für die Affinität zwischen miniScGal4 und den verschiedenen *K/Gal80*-Varianten nur ein Bereich angegeben; die Zusammenfassung aller in den Einzelexperimenten berechneten  $K_{D,app}$ -Werte ergibt einen mittleren  $K_{D,app}$  von  $1,0 \pm 0,8$  nM.

Auf der Basis des vorgestellten mathematischen Gleichgewichtsmodells wurden auch die Experimente unter Verwendung des synthetischen Peptids quantitativ ausgewertet. Hierfür standen zwei Datensätze (Verwendung von IHGal80 und NHGal80 jeweils unter Niedrigsalzbedingungen) zur Verfügung. Auch diese Ergebnisse können durch das Modell sehr gut reproduziert werden (s. Abb. 6). Zum einen konnte durch die quantitative Analyse in der Affinität zum Peptid kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verwendeten *K/Gal80*-Varianten (IHGal80: 1,35  $\mu$ M; NHGal80: 1,65  $\mu$ M) festgestellt werden. Zum anderen wurde hierbei wiederum deutlich, dass die apparente Affinität zwischen *K/Gal80* und Peptid wesentlich (ca. 1000-fach) geringer ist als jene zwischen *K/Gal80* und miniScGal4.

In diesem Abschnitt konnte mit Hilfe der mathematischen Modellierung gezeigt werden, dass die Ergebnisse der Inhibierungsexperimente vollständig kompatibel sind mit der Annahme, dass den Interaktionen der Regulatoren ein reines Dissoziationsmodell zu Grunde liegt, welches auf direkter Konkurrenz zwischen *K/Gal1* und Gal4-AD um die Bindung an *K/Gal80* beruht. Zur Erklärung der experimentellen Daten müssen somit keine weiteren Annahmen (wie z.B. partielle Dissoziation oder allosterische Transformation; s. dazu auch Diskussion Abschnitt 4.3) getroffen werden. Auf der Basis dieses Modells und unter der Annahme, dass die Affinität von *K/Gal80* zu *K/Gal4* annähernd der zu miniScGal4 entspricht, kann zudem geschlossen werden, dass die apparente Affinität zwischen *K/Gal4* und *K/Gal80* wesentlich höher ist als jene zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80*.

### 3.3. Multimerisierung von *K/Gal80* und Zusammensetzung des Komplexes aus *K/Gal80* und *K/Gal1*

*Gal80* aus *Saccharomyces cerevisiae* (*ScGal80*) besitzt die Fähigkeit zur Di- und Tetramerisierung (Melcher und Xu, 2001). Diese Selbstinteraktionen spielen eine Rolle bei der Kontrolle der Genaktivität *ScGal4*-kontrollierter Gene: Die Dimerisierung stabilisiert die Bindung des (*ScGal4*)<sub>2</sub>-(*ScGal80*)<sub>2</sub>-Komplexes an die DNA, die Tetramerisierung ist möglicherweise Voraussetzung für die stärkere Repression solcher *GAL*-Gene, welche mindestens zwei *ScGal4*-Bindestellen im Promotor besitzen (Melcher und Xu, 2001).

Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.4 legen nahe, dass auch *K/Gal80* die Fähigkeit zur Multimerisierung besitzt. Dort war gezeigt worden, dass die Affinität von *K/Gal80* zum dimerisierenden mini*ScGal4* wesentlich höher ist als zu einem synthetischen Peptid, welches aus der Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* abgeleitet wurde (und nicht dimerisieren kann). Dieser Affinitätsunterschied könnte unter anderem auf der Dimerisierungsfähigkeit von mini*ScGal4* und einer daraus resultierenden kooperativen Bindung zwischen den dimeren Formen von mini*ScGal4* und *K/Gal80* beruhen. Dies wiederum würde implizieren, dass *K/Gal80* die Fähigkeit zur Dimerisierung besitzt. Untersuchungen zum Multimerisierungsverhalten von *K/Gal80* wurden während der Arbeit durchgeführt und werden im Folgenden vorgestellt. Die biochemische Charakterisierung von *K/Gal80* sollte zudem die Grundlage für Untersuchungen zur Zusammensetzung des *K/Gal80-K/Gal1*-Komplexes bilden.

Die in den folgenden Abschnitten vorgestellten Ergebnisse wurden größtenteils mit Hilfe der experimentellen Techniken der analytischen Gelfiltration und der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) erhalten.

Die Gelfiltration ist eine chromatographische Methode und ermöglicht die Trennung gelöster Substanzen (z.B. Proteine) nach ihrer Molekülgröße. Als stationäre Phase (Gelmatrix) dient ein (in eine Säule gepacktes) poröses Material. Dessen Porengröße sowie Form und Molekulargewicht eines in der mobilen Phase gelösten Proteins bestimmen, inwiefern dieses Protein in die Gelmatrix diffundieren kann. Je kleiner ein Protein ist, umso besser kann es tendenziell in die Gelporen eindringen, wodurch sich seine Wanderungsgeschwindigkeit vermindert und seine Elution von der Säule verzögert wird. Für gleichartige Proteine gilt, dass deren Elutionsvolumen umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes ist. Somit kann durch Kalibrierung einer Säule mit Standardproteinen bekannten Molekulargewichts die Größe eines unbekanntes Proteins abgeschätzt werden (die Gleichartigkeit der Proteine vorausgesetzt).

Die Methode der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) wird in der Biochemie vor allem zur Bestimmung von Molekulargewichten und Sedimentationskoeffizienten eingesetzt. Die AUZ ist eine Absolutmethode und erfordert damit keine Kalibrierung. Die Masse eines Partikels

(z.B. eines Proteins) wird anhand seiner Sedimentation im Schwerfeld registriert. Die mit der AUZ durchführbaren Experimente lassen sich prinzipiell in zwei Kategorien unterteilen. Die erste Kategorie umfasst die dynamischen Experimente (Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente), welche der Ermittlung von Sedimentationskoeffizienten dienen. Hierbei wird ein starkes Schwerfeld angelegt, was zu einer schnellen Sedimentation der Partikel führt. Aus der Geschwindigkeit der Sedimentation lässt sich der Sedimentationskoeffizient des Partikels (bzw. die Koeffizientenverteilung bei Gemischen) ableiten, welcher unter anderem von seiner Molmasse abhängt.

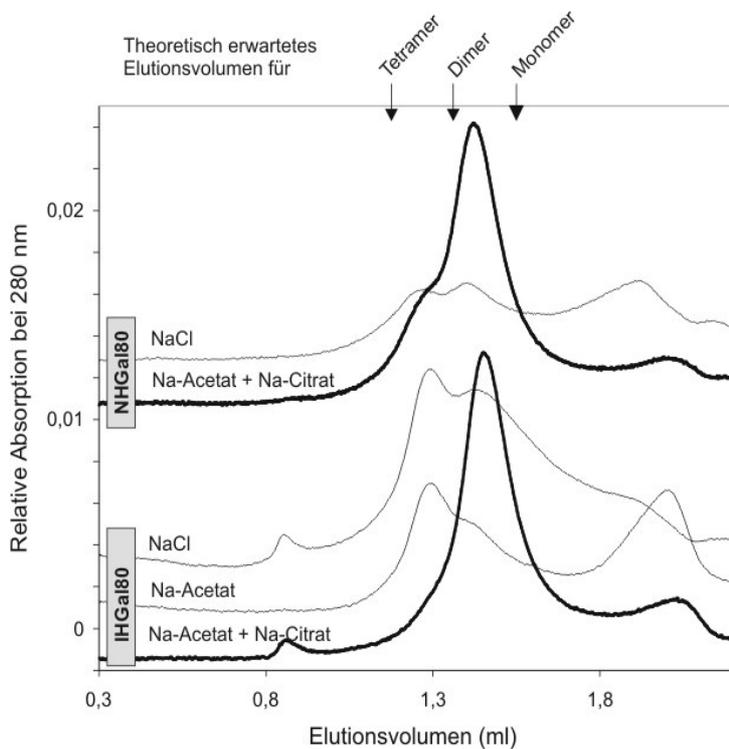
Die zweite Kategorie der mit der AUZ durchführbaren Experimente umfasst die Gleichgewichtsmessungen, welche eine genauere Bestimmung von Molekulargewichten als die dynamischen Experimente erlauben. Hierbei wird das System einem schwachen Sedimentationsfeld ausgesetzt. Die (langsame) Sedimentation der Partikel bewirkt eine Erhöhung ihrer Konzentration in Nähe des Zellbodens. Dies wiederum führt zur Zunahme der Diffusion vom Boden entgegen dem Sedimentationsfeld (da die Diffusion konzentrationsabhängig ist). Nach hinreichender Laufzeit bildet sich ein stationärer Zustand aus, wobei innerhalb der Messzelle ein exponentielles Konzentrationsprofil vorliegt. Dieses gibt unter Verwendung der experimentellen Parameter Aufschluss über die mittlere molare Masse der Partikel.

Alle in dieser Arbeit vorgestellten AUZ-Experimente sowie die entsprechenden quantitativen Auswertungen wurden von Dr. Hauke Lilie am Institut für Biotechnologie unserer Universität durchgeführt. Im Folgenden wird an den entsprechenden Stellen nicht explizit auf diese Tatsache verwiesen.

### 3.3.1. Citrat und EDTA stabilisieren eine dimere Form von *K/Gal80*

Die Untersuchungen des Multimerisierungsverhaltens von *K/Gal80* erfolgten mit den beiden gereinigten Varianten *IHGal80* und *NHGal80*. In Abbildung 9 sind typische Elutionsprofile analytischer Gelfiltrationen mit den beiden Varianten dargestellt. Befindet sich im Laufpuffer kein Citrat, wird *K/Gal80* über einen weiten Bereich von der Säule eluiert. Ein ähnliches Verhalten wurde für *ScGal80* beschrieben (Timson *et al.*, 2002) und deutet darauf hin, dass *K/Gal80* in verschiedenen Zustandsformen (wie z.B. Multimeren) existieren kann. Unter diesen Bedingungen können in der Regel (bei genügend hoher Konzentration des Proteins) mindestens zwei Peaks detektiert werden (s. Abb. 9). Möglicherweise handelt es sich dabei unter anderem um dimere und tetramere Form. AUZ-Experimente unterstützen diese Interpretation. Bedingungen, unter welchen im Gelfiltrationsexperiment zwei Peaks detektiert werden, führen im AUZ-Experiment zur Bestimmung eines apparenten Molekulargewichtes

für *K*Gal80, welches zwischen den Molekulargewichten von dimerer und tetramerer Form liegt (s. dazu auch Abb. 10).



**Abbildung 9.** Einfluss von Citrat auf die *K*Gal80-Multimerisierung. Abgebildet sind Elutionsprofile analytischer Gelfiltrationsexperimente. Jeweils gleiche Mengen (10  $\mu$ l aus 0,7  $\mu$ g/ $\mu$ l) von NHGal80 (obere 2 Profile) und IHGal80 (untere 3 Profile) wurden für die Experimente mit verschiedenen Laufpuffern eingesetzt. Der Puffer enthielt in allen Experimenten 50 mM Tris/Cl pH 7,9. Weitere Pufferkomponenten (100 mM NaCl bzw. Na-Acetat; 20 mM Na-Citrat) sind an den einzelnen Elutionsprofilen aufgeführt. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Profile entlang der Ordinate verschoben. Die Profile, welche aus Experimenten mit Citrat im Laufpuffer herrühren, sind fett dargestellt. Die Peaks in diesen Experimenten entsprechen der dimeren Form von *K*Gal80 (s. Text). Die theoretisch erwarteten Elutionsvolumina für monomeres, dimeres und tetrameres *K*Gal80 wurden zur Orientierung über dem Diagramm markiert.

In Abschnitt 3.1.1 wurde dargelegt, dass *K*Gal80 in Gegenwart von Citrat stabilisiert wird. In den Gelfiltrationsexperimenten wird nun deutlich, dass *K*Gal80 bei Anwesenheit von Citrat im Laufpuffer in einem schmalen Bereich von der Säule eluiert wird. Abhängig von Proteinpräparation und Citrat-Konzentration wird nun ausschließlich ein Peak detektiert, entsprechend einem Molekulargewicht zwischen 76 und 96 kDa (die theoretischen Molekulargewichte von IHGal80 und NHGal80 betragen 52,2 bzw. 53,8 kDa). Offensichtlich bewirkt also Citrat die Stabilisierung einer Zustandsform von *K*Gal80. Diese Entität konnte durch AUZ-Experimente eindeutig als dimere Form identifiziert werden (Lilie, persönliche Mitteilung; s. dazu auch Abb. 10). Der „Citrat-Effekt“ (Stabilisierung der dimeren Form von *K*Gal80) konnte qualitativ in allen durchgeführten Experimenten und mit beiden *K*Gal80-Varianten beobachtet werden. Die Quantität ist abhängig von der *K*Gal80-Präparation, das heißt, in verschiedenen Proteinpräparationen sind unter Umständen verschiedene Konzentrationen an Citrat nötig, um *K*Gal80 vollständig in die dimere Form zu überführen. In den durchgeführten Experimenten waren dafür 20-50 mM Citrat (Na-Citrat) ausreichend.

Citrat besitzt die Fähigkeit, zweiwertige Metallionen zu chelatieren. Der „Citrat-Effekt“ könnte somit darauf beruhen, dass (z.B. im Wasser als Verunreinigungen enthaltene) zweiwertigen Metallionen durch Citrat gebunden und somit austitriert werden. Um diese Hypothese zu testen, wurde EDTA, ein potenterer Chelator, hinsichtlich seines Effektes auf die Multimerisierung von *K/Gal80* hin untersucht. Die Untersuchungen erfolgten mit der Variante IHGal80. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

Die in diesen Experimenten verwendete IHGal80-Präparation ließ sich durch die Anwesenheit von 20 mM Na-Citrat nicht vollständig in die dimere Form überführen. Zu diesem Zweck waren hier 50 mM Na-Citrat erforderlich (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit von lediglich 20 mM Na-Citrat im Laufpuffer führte im Gelfiltrationsexperiment zur Detektion von zwei Peaks (zweites Elutionsprofil in Abb. 10A). Ein mit der gleichen Proteinpräparation unter ähnlichen Pufferbedingungen (wiederum mit 20 mM Na-Citrat) durchgeführtes AUZ-Experiment führte zur Bestimmung eines apparenten Molekulargewichtes von 171 kDa (Abb. 10B oben), was zwischen den Molekulargewichten von IHGal80-Dimer (104 kDa) und -Tetramer (208 kDa) liegt. Die entsprechenden experimentellen Daten lassen sich gut anpassen unter der Annahme, dass in diesem Fall ein Gemisch aus Dimeren und Tetrameren vorliegt.

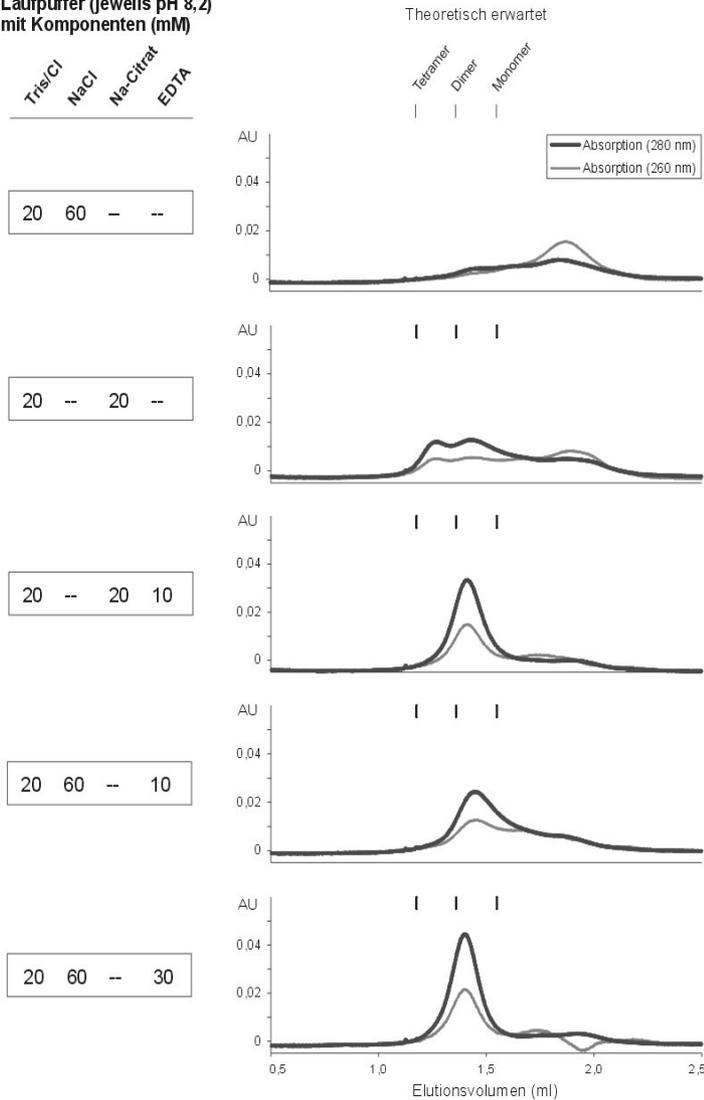
In Anwesenheit von 30 mM EDTA im Laufpuffer wurde im Gelfiltrationsexperiment ein singulärer symmetrischer Peak detektiert, dessen Elutionsvolumen annähernd dem für das Dimer theoretisch erwarteten Elutionsvolumen entspricht (unteres Elutionsprofil in Abb. 10A). Das entsprechende AUZ-Experiment in Anwesenheit von 30 mM EDTA (Abb. 10B unten) führte zur Bestimmung eines apparenten Molekulargewichtes von 114 kDa. Dies entspricht wiederum annähernd dem Molekulargewicht des IHGal80-Dimers.

Diese Experimente zeigen zum einen, dass die durch Gelfiltrationsexperimente erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen der AUZ-Experimente korrelieren. Bedingungen, welche im Gelfiltrationsexperiment zur Detektion eines singulären Peaks führen, führen im AUZ-Experiment zur Bestimmung eines apparenten Molekulargewichtes, das dem *K/Gal80*-Dimer entspricht. Bedingungen, unter welchen im Gelfiltrationsexperiment zwei Peaks detektiert werden, führen im AUZ-Experiment zur Bestimmung eines apparenten Molekulargewichtes zwischen den Molekulargewichten von *K/Gal80*-Dimer und -Tetramer.

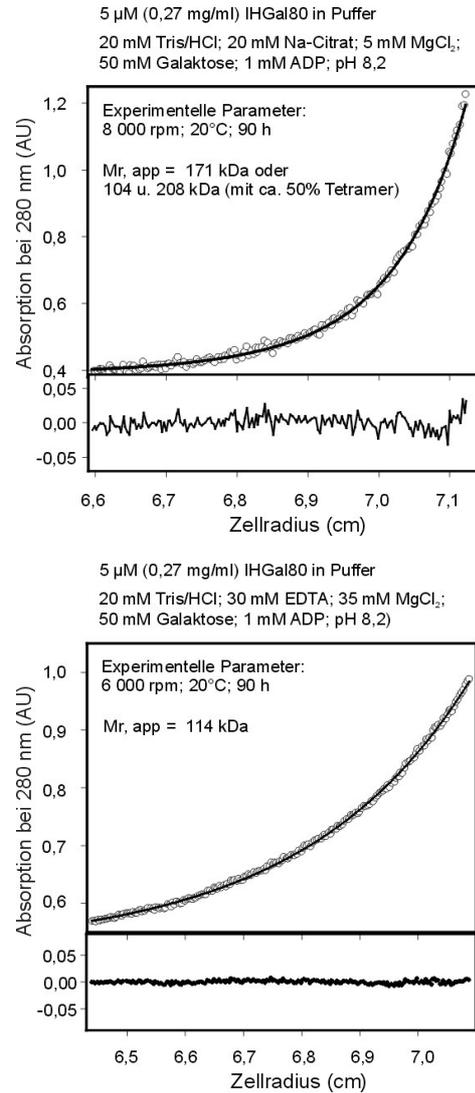
Zum anderen offenbaren die Experimente, dass auch EDTA die Fähigkeit zur Stabilisierung der dimeren Form von *K/Gal80* besitzt. Die Stärke des Effektes von EDTA ist (wie auch bei Citrat) von seiner Konzentration abhängig (vgl. dazu in Abb. 10A die zwei unteren Elutionsprofile).

## A Gelfiltrationen

Laufpuffer (jeweils pH 8,2)  
mit Komponenten (mM)



## B Analytische UZ

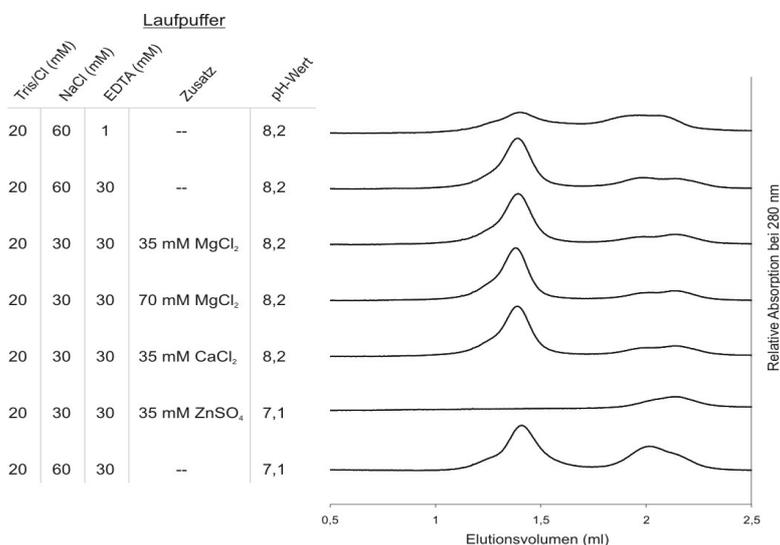


**Abbildung 10.** Einfluss von EDTA auf die *K*Gal80-Multimerisierung. (A) Elutionsprofile analytischer Gelfiltrationsexperimente. Jeweils gleiche Mengen von IHGal80 (10  $\mu$ l aus 1,4 mg/ml) wurden in Gelfiltrationsexperimenten mit verschiedenen Laufpuffern (Zusammensetzung s. linke Seite) eingesetzt. Es ist zu beachten, dass bei der hier verwendeten Proteinpräparation 20 mM Na-Citrat nicht ausreichten, um *K*Gal80 vollständig in die dimere Form zu überführen (2. Profil von oben); zu diesem Zweck waren hier 50 mM Na-Citrat erforderlich (Daten nicht gezeigt). (B) Darstellung der Ergebnisse analytischer Ultrazentrifugationen (Sedimentationsgleichgewicht). Die Experimente wurden mit der gleichen Proteinpräparation durchgeführt wie die unter (A) gezeigten. Die Konzentration von IHGal80 betrug jeweils 0,27 mg/ml (5  $\mu$ M). Die Messpuffer enthielten jeweils 20 mM Tris/HCl und 20 mM Na-Citrat (oben) oder 30 mM EDTA (unten). Die Experimente dienen unter anderem der Messung der Interaktion mit *K*Gal1; aus diesem Grund enthielten die Messpuffer außerdem jeweils 5 mM MgCl<sub>2</sub> (oben; 5 mM; unten: 35 mM), 50 mM Galaktose und 1 mM ADP. Der pH-Wert der Puffer betrug jeweils 8,2. In dem oben gezeigten Experiment wurde ein apparentes Molekulargewicht (Mr,app) von 171 kDa ermittelt. Die Daten lassen sich gut anpassen unter der Annahme des Auftretens von IHGal80-Dimeren und -Tetrameren in diesem Ansatz. Analog dazu wurden in dem entsprechenden Gelfiltrationsexperiment in Anwesenheit von 20 mM Na-Citrat zwei Peaks detektiert [2. Elutionsprofil unter (A)]. In dem unten gezeigten Experiment wurde ein apparentes Molekulargewicht von 114 kDa ermittelt, was ungefähr dem Molekulargewicht des IHGal80-Dimers (104 kDa) entspricht. Analog dazu wurde in dem entsprechenden Gelfiltrationsexperiment in Anwesenheit von 30 mM EDTA ein singulärer symmetrischer Peak detektiert [unterstes Elutionsprofil unter (A)]. Unter den Diagrammen sind jeweils die Abweichungen der Anpassungen (zur Ermittlung des apparenten Molekulargewichtes) von den Messwerten dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass *K/Gal80* die Fähigkeit zur Multimerisierung besitzt. Eindeutig konnte eine dimere Form identifiziert werden, welche in Anwesenheit von Citrat oder EDTA stabilisiert wird. In Abwesenheit dieser Agenzien kann zudem eine Form höheren Molekulargewichtes detektiert werden, wobei die experimentellen Befunde die Interpretation unterstützen, dass es sich hierbei um eine tetramere Form von *K/Gal80* handelt. In Hinsicht auf die Multimerisierung scheinen die beiden homologen Proteine *K/Gal80* und *ScGal80* somit ein sehr ähnliches Verhalten auszuprägen.

### 3.3.2. Konkurrenz gegen den Effekt von EDTA

EDTA und Citrat besitzen die Fähigkeit, eine dimere Form von *K/Gal80* zu stabilisieren. Dieser Effekt könnte auf der Chelatierung eines putativen (als Verunreinigung enthaltenen) Metallions beruhen. Unter dieser Annahme sollte sich der Effekt durch Austitrieren von EDTA mit diesem oder einem zu EDTA affineren Metallion aufheben lassen. In Abb. 11 sind die Ergebnisse derartiger Konkurrenzexperimente zur Identifizierung des putativen Metallions gezeigt. Hier wurde mit Hilfe der Technik der Gelfiltration untersucht, ob durch Austitrieren von EDTA mit verschiedenen zweiwertigen Metallionen dessen Effekt auf *IHGal80* aufgehoben wird.  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  haben in dieser Hinsicht keine Auswirkungen. Die Zugabe von  $Zn^{2+}$  zum Laufpuffer hingegen hat einen sehr deutlichen Effekt auf das Elutionsprofil von *IHGal80*. Es kann unter diesen Bedingungen keinerlei Protein detektiert werden; die stabilisierende Wirkung von EDTA ist also aufgehoben. Ob dieser Effekt auf dem Austitrieren von EDTA beruht oder auf einer Wirkung von  $Zn^{2+}$  auf *IHGal80* selbst, kann hiermit nicht geklärt werden.



**Abbildung 11.** Konkurrenz gegen den Effekt von EDTA auf *K/Gal80*. Dargestellt sind Elutionsprofile von Gelfiltrationsexperimenten, welche mit jeweils gleicher Menge *IHGal80* (10  $\mu$ l aus 1,3 mg/ml) durchgeführt wurden. Die hier verwendete *IHGal80*-Charge wurde zuvor zweimal jeweils über Nacht gegen Tris/HCl mit 30 mM bzw. 1 mM EDTA (pH 8,2) dialysiert. Die Zusammensetzung des Laufpuffers in den einzelnen Experimenten ist auf der linken Seite angegeben.

Die drei getesteten Metallionen besitzen verschiedene Affinitäten zu EDTA (s. Tab. 4 in Abschnitt 4.3),  $Mg^{2++}$  die niedrigste, gefolgt von  $Ca^{2++}$  und  $Zn^{2++}$ . Sollte dem Effekt von EDTA auf *K/Gal80* die Chelatierung eines putativen Metallions zu Grunde liegen, so lässt sich aus den hier vorgestellten Ergebnissen schlussfolgern, dass es sich dabei um ein Metallion handeln muss, welches mit höherer Affinität als  $Ca^{2++}$  an EDTA bindet.

Sowohl die hohe Konzentration an EDTA (in der Regel 30 mM), welche zur vollständigen Überführung von *K/Gal80* in die dimere Form nötig ist, als auch die Tatsache, dass EDTA in dieser Hinsicht ähnlich effektiv ist wie Citrat (bzw. ähnlich uneffektiv trotz wesentlich besserer Fähigkeit zur Chelatierung) sprechen jedoch eher gegen die ursprüngliche Annahme, dass der „Citrat-Effekt“ auf der Chelatierung zweiwertiger Metallionen beruht (s. dazu Diskussion in Abschnitt 4.3).

### 3.3.3. Komposition und Stöchiometrie des *K/Gal1-K/Gal80*-Komplexes

Der Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* kommt eine Schlüsselrolle beim Prozess der Aktivierung des Galaktose-Schalters zu. In der Vergangenheit sind Untersuchungen zur Zusammensetzung des Komplexes mit den entsprechenden homologen Proteinen aus *S. cerevisiae* (*ScGal80* und *ScGal3* bzw. *ScGal1*) durchgeführt worden (Timson *et al.*, 2002). Mit Hilfe von Gelfiltrationsexperimenten wurde dabei (ATP- und Galaktose-abhängig) die Formation eines *ScGal80-ScGal3* (und *ScGal80-ScGal1*) Komplexes nachgewiesen. Das Elutionsvolumen legte in diesen Experimenten nahe, dass der Komplex aus jeweils einem Monomer der beiden interagierenden Proteine aufgebaut ist. In Zusammenhang mit der Tatsache, dass *ScGal80* dimerisieren kann (Melcher und Xu, 2001), könnte dies ein Hinweis auf eine Konkurrenz zwischen *ScGal80*-Dimerisierung und der Bindung an *ScGal3* sein (Pilauri *et al.*, 2005). Da *ScGal4* und *ScGal80* in jeweils dimerer Form kooperativ miteinander interagieren (Mecher und Xu, 2001; die Bindung von *ScGal80* an *ScGal4* führt zur Stabilisierung der *ScGal4*-DNA-Interaktion, wahrscheinlich durch Stabilisierung der *ScGal4* Dimerisierung), müsste in diesem Fall *ScGal3* im Zuge der Aktivierung des Galaktose-Schalters sowohl gegen die *ScGal4-ScGal80* Bindung (implizit oder explizit) als auch gegen die *ScGal80* Dimerisierung (explizit) kompetieren. Der Modus der Interaktion zwischen *ScGal80* und *ScGal3* bzw. *K/Gal80* und *K/Gal1* spielt somit eine wichtige Rolle bei der Operation des Galaktose-Schalters. Insbesondere in Hinsicht auf eine quantitative mathematische Modellierung des Galaktose-Schalters wurde aus diesem Grund die Zusammensetzung des *K/Gal1-K/Gal80*-Komplexes untersucht.

Zunächst sollte die Charakterisierung des *K/Gal1-K/Gal80*-Komplexes mit Hilfe der Technik der Gelfiltration erfolgen (ähnlich wie in Timson *et al.*, 2002). Zu diesem Zweck wurde vor Beginn der Versuche eine N-terminal 6xHis-markierte Variante von *K/Gal1* (NHGal1) gereinigt und untersucht. In Gelfiltrationsexperimenten wurde dieses Protein unter allen getesteten Bedingungen als singulärer Peak eluiert, welcher einem Molekulargewicht von ca. 51 kDa entspricht (Daten nicht gezeigt). Das tatsächliche Molekulargewicht von NHGal1 beträgt 58 kDa. AUZ-Experimente (s. Abb. 12) bestätigten die Vermutung, dass es sich bei dieser Spezies um das Monomer von NHGal1 handelt.

Die Formierung des *K/Gal1-K/Gal80*-Komplexes erfolgte durch Zugabe eines Überschusses an *K/Gal80* (IHGal80) in Anwesenheit von Galaktose und ADP. Durch Zugabe von ADP anstelle von ATP sollte ein enzymatischer Umsatz der Galaktose durch *K/Gal1* verhindert werden; die Fähigkeit zur Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* bleibt dadurch erhalten (Zenke *et al.*, 1996). Der Bindepuffer und der Laufpuffer für die Gelfiltrationsexperimente enthielten in diesen Experimenten weder Citrat noch EDTA (das *K/Gal80*-Dimer sollte hier nicht stabilisiert werden). Der formierte *K/Gal1-K/Gal80*-Komplex sollte im Gelfiltrationsexperiment durch eine Verschiebung des Elutionsvolumens von NHGal1 detektiert werden. Die Ergebnisse dieses Experimentes (Daten nicht gezeigt) sind wenig aussagekräftig. Die Anwesenheit von IHGal80 führte zwar zu einer Verschiebung des Elutionsvolumens von NHGal1, diese war jedoch sehr gering. Die Änderung war geringer als sie selbst bei der Formation des kleinstmöglichen Komplexes aus NHGal1 und IHGal80 (Komplex mit 110 kDa bei Monomer-Monomer-Interaktion) erwartet worden war. Hieraus wurde der Schluss gezogen, dass entweder der Komplex tatsächlich einem Monomer-Monomer-Komplex entspricht, welcher auf Grund seiner Konformation nur geringfügig schneller von der Säule eluiert wird als NHGal1 selbst oder aber, dass der formierte Komplex über die Dauer des Gelfiltrationsexperimentes nicht stabil ist.

Aufschlussreicher waren in dieser Hinsicht AUZ-Experimente. Zur Vereinfachung der Interpretation der Ergebnisse wurden für diese Experimente Bedingungen gewählt, unter denen *K/Gal80* vollständig in dimerer Form vorliegt. Der Messpuffer enthielt aus diesem Grund jeweils 30 mM EDTA. Die Interaktion zwischen *K/Gal80* und *K/Gal1* ist ATP- (bzw. ADP-) abhängig und infolgedessen (zur Komplexierung des Nukleotids) auch abhängig von der Verfügbarkeit an  $Mg^{2+}$ . Aus diesem Grund wurde dem Puffer 35 mM  $MgCl_2$  zugefügt, wobei sichergestellt wurde, dass der Effekt von EDTA auf *K/Gal80* dadurch nicht aufgehoben wird (s. Abb. 10B und 11). Galaktokinase-Inhibierungsexperimente zeigten, dass auch unter diesen Pufferbedingungen eine Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* erfolgt (Daten nicht gezeigt).

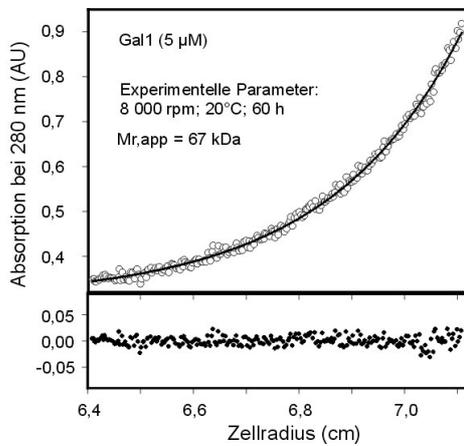
Die AUZ-Experimente wurden wiederum unter Verwendung der beiden Proteinvarianten NHGal1 und IHGal80 durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 12

dargestellt. Für NHGal1 wurde unter den gewählten Bedingungen ein apparentes Molekulargewicht von 67 kDa ermittelt (Abb. 12A). Dies entspricht ungefähr dem berechneten Gewicht des Monomers (58 kDa). Für die Probe, in welcher NHGal1 und IHGal80 in gleichen molaren Konzentrationen vorlagen, wurde durch das Sedimentationsgleichgewichtsexperiment ein apparentes Molekulargewicht von 199 kDa ermittelt (Abb. 12B). Dies entspricht in etwa dem Molekulargewicht eines putativen (NHGal1)<sub>2</sub>-(IHGal80)<sub>2</sub>-Komplexes (220 kDa).

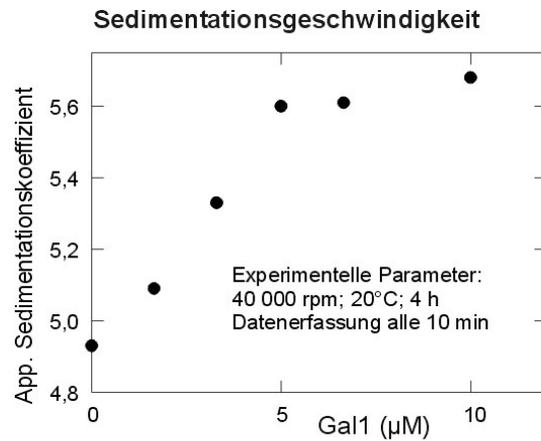
In Abbildung 12C sind die Ergebnisse von Experimenten dargestellt, in welchen steigende Mengen NHGal1 zu einer konstanten Menge IHGal80 titriert wurden. Es ist zu erkennen, dass die Zugabe steigender Mengen an NHGal1 jeweils zu einer Zunahme des Sedimentationskoeffizienten und apparenten Molekulargewichtes führt. Bei äquimolaren Konzentrationen der beiden Proteine (jeweils 5 µM) erreichen diese beiden Werte jeweils ein Maximum. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Proteine mit einer Stöchiometrie von 1:1 interagieren. Das Maximum des apparenten Molekulargewichtes liegt bei 199 kDa (s. Abb. 12B). Da in dem Gleichgewichtsexperiment das mittlere Molekulargewicht aller vorhandenen Spezies ermittelt wird, führt eine Erhöhung der NHGal1-Konzentration über 5 µM zu einem Absinken des apparenten Molekulargewichtes.

Zusammenfassend lässt sich hier festhalten, dass mit Hilfe der AUZ-Experimente die Formation des *K*Gal1-*K*Gal80-Komplexes nachgewiesen werden konnte. Durch Titrationsexperimente konnte gezeigt werden, dass beide Proteine mit einer Stöchiometrie von 1:1 interagieren. Im Zusammenhang mit den Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der formierte Komplex bei äquimolaren Konzentrationen der beiden Proteine unter den gewählten Bedingungen aus jeweils zwei Molekülen *K*Gal80 und *K*Gal1 aufgebaut ist. Entsprechende experimentelle Untersuchungen (durch Gelfiltrationsexperimente) zur Interaktion der beiden Proteine *Sc*Gal80 und *Sc*Gal3 aus *S. cerevisiae* legten die Formation eines Heterodimers nahe (Timson *et al.*, 2002). Unter anderem auf der Basis dieser Daten wurde in Pilauri *et al.* (2005) ein Modell vorgeschlagen, nach welchem die Bindung von *Sc*Gal3 an *Sc*Gal80 gegen dessen Dimerisierung kompetiert. Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu dieser Hypothese. Zumindest für die Proteine aus *K. lactis* scheint eine derartige Konkurrenz zwischen *K*Gal80-Dimerisierung und der Bindung an *K*Gal1 nicht vorzuliegen (s. dazu auch Diskussion in Abschnitt 4.4).

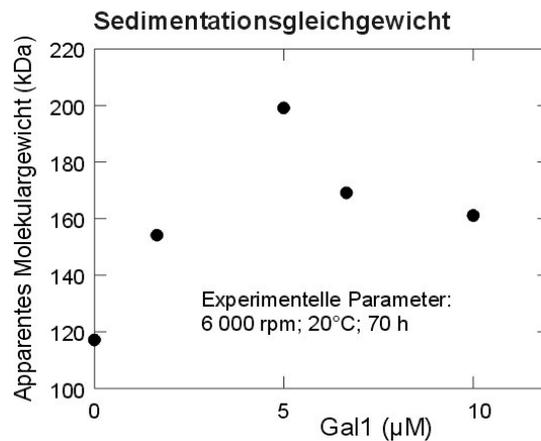
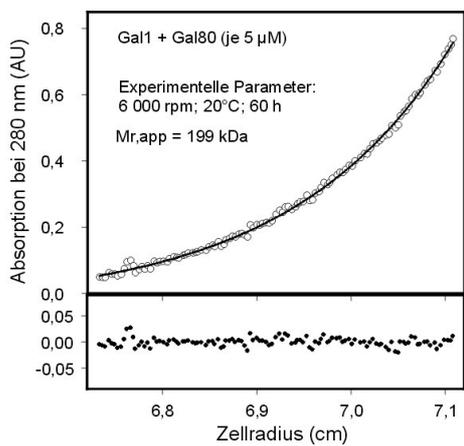
**A Gleichgewicht mit Gal1**



**C Titration von Gal1 zu Gal80**



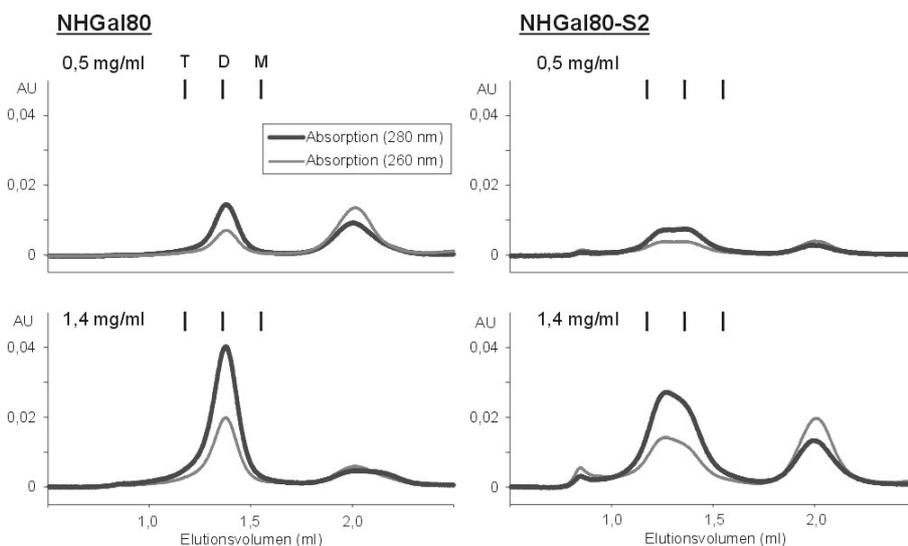
**B Gleichgewicht mit Gal1 und Gal80**



**Abbildung 12.** Bestimmung der Stöchiometrie und Zusammensetzung des *K/Gal1-K/Gal80*-Komplexes. Gezeigt sind Ergebnisse von AUZ-Experimenten. Alle Messungen erfolgten in Puffer mit 20 mM Tris/HCl; 30 mM EDTA; 35 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM Galaktose; 1 mM ADP; pH 8,2. (A) Sedimentationsgleichgewichtsexperiment zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von *K/Gal1*. Die Konzentration von *K/Gal1* (Variante NHGal1) betrug 5 µM. Das ermittelte apparente Molekulargewicht ( $M_{r,app}$ ) liegt bei 67 kDa, die Abweichungen der entsprechenden Anpassung von den Messwerten sind unter dem Diagramm abgebildet. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht von NHGal1 beträgt 58 kDa. (B) Gleichgewichtsexperiment zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes des *K/Gal1-K/Gal80*-Komplexes bei äquimolaren Konzentrationen beider Proteine. Die Messung erfolgte in Anwesenheit von jeweils 5 µM NHGal1 und IHGal80. Die Anpassung ergab ein apparentes Molekulargewicht von 199 kDa, die entsprechenden Abweichungen von den Messwerten sind unter dem Diagramm dargestellt. Das theoretische Molekulargewicht eines (NHGal1)<sub>2</sub>-(IHGal80)<sub>2</sub>-Komplexes beträgt 220 kDa. (C) Titrations zur Bestimmung der Stöchiometrie des *K/Gal1-K/Gal80*-Komplexes. Alle Messungen erfolgten in Anwesenheit von 5 µM IHGal80. Zu diesen Ansätzen wurden steigende Mengen an NHGal1 titriert. In Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten wurden die apparenten Sedimentationskoeffizienten der Ansätze ermittelt (oben). Im Anschluss wurden diese Ansätze in Gleichgewichtsexperimenten zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte benutzt (unten). Bei äquimolaren Konzentrationen von IHGal80 und NHGal1 (5 µM) erreichen Sedimentationskoeffizient und apparentes Molekulargewicht ( $M_{r,app}$  = 199 kDa) jeweils ein Maximum.

### 3.3.4. *K*Gal80-S2 zeigt ein vom Wildtypprotein verschiedenes Elutionsprofil

In den Gelfiltrationsexperimenten wurden neben den beiden Wildtypvarianten von *K*Gal80 (NHGal80 und IHGal80), welche sich hierbei nicht signifikant unterschieden, weitere Varianten untersucht. Ein vom Wildtypprotein deutlich verschiedenes Elutionsprofil zeigten die Varianten *K*Gal80-S0 (NHGal80-S0) und *K*Gal80-S2 (NHGal80-S2), welche sich durch jeweils einen Aminosäureaustausch vom Protein NHGal80 unterscheiden (s. dazu Material und Methoden Abschnitt 2.4). Diese Varianten sind nicht in der Lage, an *K*Gal1 zu binden und bilden *in vivo* einen super-reprimierten Phänotyp aus (Zenke *et al.*, 1999). Ohne die Anwesenheit von Citrat oder EDTA im Puffer treten diese Varianten fast ausschließlich in der putativen tetrameren Form auf (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 13.** Elutionsverhalten von *K*Gal80-S2 im Vergleich zum Wildtypprotein. Dargestellt sind Elutionsprofile von Gelfiltrationsexperimenten, welche jeweils mit dem gleichen Laufpuffer (20 mM Tris/HCl; 30 mM EDTA; 35 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,2) durchgeführt wurden. Auf der linken Seite sind die mit NHGal80 erhaltenen Elutionsprofile abgebildet, auf der rechten Seite jene mit NHGal80-S2. Jeweils 10 µl aus Proteinlösungen mit 0,5 mg/ml (oben) bzw. 1,4 mg/ml (unten) wurden aufgetragen. Über den Diagrammen sind die theoretisch erwarteten Elutionsvolumina für *K*Gal80-Monomer (M), -Dimer (D) und -Tetramer (T) markiert.

In Abbildung 13 sind die Ergebnisse von Gelfiltrationsexperimenten gezeigt, welche in Anwesenheit von 30 mM EDTA im Laufpuffer durchgeführt wurden. Unter diesen Bedingungen kann bei der Wildtypvariante HNGal80 ausschließlich eine dimere Form detektiert werden. Deutlich verschieden davon ist das Elutionsprofil der Variante NHGal80-S2. Diese wird unter den gewählten Bedingungen über einen weiteren Bereich eluiert, wobei kein singulärer symmetrischer Peak detektiert werden kann. Vielmehr scheinen hier mindestens zwei Entität-

ten vorzuliegen, wobei ein Teil dieser Entitäten seinem Laufverhalten nach ein größeres Molekulargewicht als die dimere Form besitzt. Auch hier äußert sich demnach wieder die im Vergleich zum Wildtyp Protein stärkere Tendenz zur Bildung von Multimeren höherer Ordnung.

### 3.3.5. Einfluss der Multimerisierung von *K/Gal80* auf die Bindung an *K/Gal1*

Im vorangegangenen Abschnitt wurde dargelegt, dass die untersuchten *K/Gal80*-Varianten, welche nicht zur Bindung an *K/Gal1* befähigt sind (*Gal80-S0*, *-S2*), im Vergleich zum Wildtypprotein jeweils eine stärkere Tendenz zur Bildung von Multimeren höherer Ordnung haben. Eine Sekundärstrukturvorhersage von *K/Gal80* mit anschließendem Alignment auf Ebene der Sekundärstruktur mit Proteinen bekannter Struktur (Programm 3D-PSSM auf [www.sbg.bio.ac.uk](http://www.sbg.bio.ac.uk); Kelley *et al.*, 2000) führt zur Identifizierung der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* als dem Protein mit der stärksten Sekundärstrukturähnlichkeit zu *K/Gal80* (Klose, 2004). Überträgt man die Mutationen von *K/Gal80*-Varianten, welche nicht zur Bindung an *K/Gal1* (*Gal80-S0*, *-S1*, *-S2*) oder *K/Gal4* (*Gal8031*) befähigt sind, auf das Strukturmodell der GFOR, so lokalisieren diese Mutationen in einem Bereich, welcher in die Di- und/oder Tetramerisierung der GFOR involviert ist (Amuel, 2003). Dies könnte zu der Vermutung führen, dass eine Selbstinteraktion (Di- und/oder Tetramerisierung) von *K/Gal80* gegen die Interaktion(en) mit *K/Gal1* und/oder *K/Gal4* kompetiert.

Unter bestimmten Voraussetzungen ließe sich eine derartige Konkurrenz durch Selbstinteraktion mit Hilfe des Galaktokinase-Inhibierungsexperimentes testen. Die Variante *NHGal80-S2* besitzt die Fähigkeit zur Selbstinteraktion (s. voriger Abschnitt), kann jedoch nicht an *K/Gal1* binden und hat demzufolge keinen Einfluss auf dessen enzymatische Aktivität (s. Abschnitt 3.2.1). Unter den Annahmen, dass die Selbstinteraktionen von *NHGal80-S2* denen des Wildtypproteins qualitativ entsprechen und dass diese Variante (demzufolge) auch mit dem Wildtypprotein (*NHGal80*) interagieren kann, dass also die Formation von Mischkomplexen aus *NHGal80* und *NHGal80-S2* möglich ist, sollte eine gegen die *K/Gal1* Bindung kompetierende Assoziation dieser beiden *K/Gal80*-Varianten detektierbar sein. In diesem Fall sollte sich die Konkurrenz durch „Selbst“-Interaktion dadurch äußern, dass die Zugabe von *NHGal80-S2* zu einem Gemisch aus *K/Gal1* und *NHGal80* zu einer Freisetzung von *K/Gal1* und damit zu einer Zunahme der Galaktokinase-Aktivität führt.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse derartiger Experimente zur Untersuchung des Einflusses von *NHGal80-S2* auf die inhibitorische Aktivität von *NHGal80* dargestellt. Es konnte mit diesen Experimenten eindeutig gezeigt werden, dass die Zugabe von *NHGal80-S2* zu einem

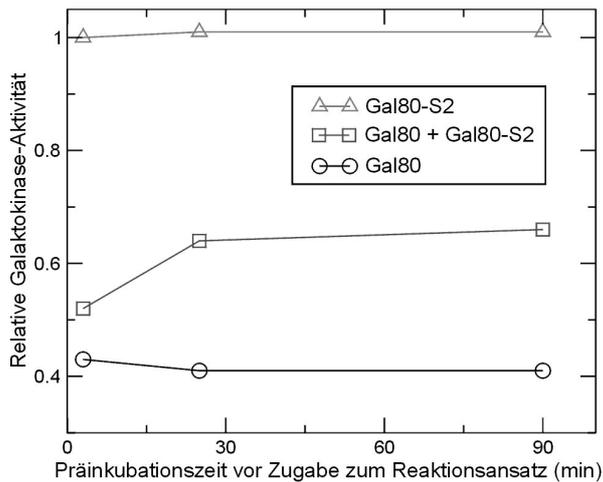
Gemisch aus NHGal1 und NHGal80 zu einer Steigerung der Galaktokinase-Aktivität führt, dass also NHGal80-S2 gegen die NHGal80-abhängige Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* kompetiert. Entsprechende Experimente mit der Variante IHGal80 (anstelle von NHGal80) führten zu sehr ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

In qualitativer Hinsicht ähneln sich damit die Effekte von NHGal80-S2 und Gal4 (miniScGal4 bzw. *K/Gal4*-Aktivierungsdomäne; s. Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4) auf die inhibitorische Aktivität von *K/Gal80*. Allerdings konnte in den mit NHGal80-S2 durchgeführten Experimenten eine starke Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit NHGal80 festgestellt werden. Werden die beiden Proteine NHGal80 und NHGal80-S2 vor der Zugabe zum Reaktionsansatz gemischt, so lässt deren sofortige Zugabe zum Messansatz und der anschließende sofortige Start der Reaktion nur einen schwachen Effekt von NHGal80-S2 erkennen. Erst eine längere Präinkubation der beiden *K/Gal80*-Varianten (im Minutenbereich) lässt den Effekt von NHGal80-S2 verstärkt hervortreten (Abb. 14A). Unter der Annahme, dass der Effekt von NHGal80-S2 auf Bindung an NHGal80 beruht, deutet dies auf eine langsame Gleichgewichtseinstellung zwischen den beteiligten Bindungsprozessen hin. In Abbildung 14B sind die Ergebnisse eines Experimentes dargestellt, mit dessen Hilfe geprüft wurde, ob der von NHGal80-S2 hervorgerufene Effekt auf NHGal80 reversibel ist. Zu diesem Zweck wurden NHGal80 und NHGal80-S2 für 30 min entweder getrennt oder zusammen präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe dieser Bindeansätze zu jeweils zwei Reaktionsansätzen (und damit einhergehend eine Verdünnung). Jeweils einer der Reaktionsansätze wurde sofort (durch Zugabe von Galaktose) gestartet, der jeweils andere wurde vor der Zugabe von Galaktose für weitere 30 min inkubiert. Erfolgte der Start der Reaktion sofort nach Zugabe der Bindeansätze, so war die Galaktokinase-Aktivität des Ansatzes mit den gemeinsam präinkubierten *K/Gal80*-Varianten deutlich höher als die des Ansatzes, zu welchem die Proteine getrennt zugegeben wurden. Dies zeigt wiederum (s. oben), dass der Effekt von NHGal80-S2 stärker bei längerer Präinkubation mit NHGal80 hervortritt. Die Galaktokinase-Aktivitäten der nach 30-minütiger Inkubation gestarteten Reaktionsansätze jedoch zeigten keinen signifikanten Unterschied mehr. Der zunächst starke Effekt von NHGal80-S2 nach gemeinsamer Präinkubation mit NHGal80 ging also durch die Verdünnung im Reaktionsansatz wieder zurück. Unter der Annahme, dass der Effekt von NHGal80-S2 auf Bindung an NHGal80 beruht, bedeutet dies, dass sich zwischen den beteiligten Bindungen auf Grund der veränderten Konzentrationsverhältnisse (Verdünnung) ein neues Gleichgewicht einstellte. Entsprechend stellte sich dieses Gleichgewicht in dem Ansatz ein, zu welchem NHGal80 und NHGal80-S2 getrennt zugegeben wurden.

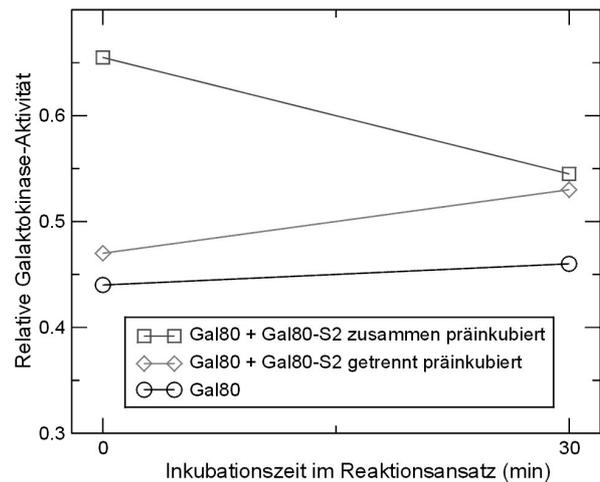
Somit ist gezeigt, dass der Effekt von NHGal80-S2 auf NHGal80 reversibel ist. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit der Hypothese, dass der Effekt auf einer Bindung zwischen NHGal80 und NHGal80-S2 beruht. Unter dieser Annahme müsste mindestens einer der be-

teiligten Prozesse (Dissoziation von NHGal80 bzw. NHGal80-S2 oder Assoziation der beiden Varianten) relativ langsam sein.

### A Gemeinsame Präinkubation von Gal80 und Gal80-S2



### B Inkubation im Messansatz nach gemeinsamer und getrennter Präinkubation von Gal80 und Gal80-S2



**Abbildung 14.** Einfluss von *K*Gal80-S2 auf die *K*Gal80-abhängige Inhibierung der *K*Gal1-Aktivität. Die Galaktokinase-Messungen wurden unter Hochsalzbedingungen (100 mM K-Acetat) mit der *K*Gal1-Variante NHGal1 durchgeführt. In den hier dargestellten Experimenten wurden die *K*Gal80-Varianten NHGal80 (=Gal80) und NHGal80-S2 (=Gal80-S2) verwendet. Beide Proteine waren in Dialysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0; 20 mM Na-Citrat; 10% Glycerin) gelagert; eventuelle Präinkubationen erfolgten ebenfalls in diesem Puffer. (A) Abhängigkeit des Effektes von *K*Gal80-S2 von der Zeit der Präinkubation mit *K*Gal80. NHGal80 (20  $\mu$ M) und NHGal80-S2 (100  $\mu$ M) wurden jeweils einzeln (Kreise bzw. Dreiecke) oder zusammen (rote Quadrate) bei 30°C präinkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils gleiche Volumina dieser Präinkubationsansätze in Reaktionsansätze zur Messung der Galaktokinase-Aktivität von *K*Gal1 überführt (Verdünnung 1:50 nach Zugabe von Galaktose) und die Reaktionen sofort durch Zugabe von Galaktose gestartet. In den Reaktionsansätzen betrug die Konzentrationen 0,4  $\mu$ M (NHGal80) bzw. 2,0  $\mu$ M (NHGal80-S2). (B) Der Effekt von *K*Gal80-S2 ist reversibel. NHGal80 und NHGal80-S2 wurden getrennt oder zusammen für 30 min bei 30°C präinkubiert (Konzentrationen wie unter (A)). Anschließend erfolgte die Zugabe (und somit 1:50 Verdünnung) dieser Bindeansätze zu jeweils zwei Reaktionsansätzen. Im Fall der durch graue Rhomben dargestellten Messwerte erfolgte die Zugabe von NHGal80 und NHGal80-S2, welche getrennt präinkubiert worden waren, zu einem Reaktionsansatz. Die Konzentrationen der Proteine in den Reaktionsansätzen betrug 0,4  $\mu$ M (NHGal80) bzw. 2,0  $\mu$ M (NHGal80-S2). Jeweils einer der Reaktionsansätze wurde sofort durch Zugabe von Galaktose gestartet, der jeweils andere wurde zuvor für weitere 30 min inkubiert.

Unter den eingangs genannten Voraussetzungen geben diese Experimente einen Hinweis darauf, dass eine Selbstinteraktion von *K*Gal80 gegen die Bindung an *K*Gal1 kompetiert. Wäre diese Konkurrenz stark, also der  $K_{D,app}$  der entsprechenden Selbstinteraktion von *K*Gal80 vergleichbar mit dem  $K_{D,app}$  der *K*Gal1-*K*Gal80-Interaktion, so hätte sich diese Tatsache bereits in dem einfachen Galaktokinase-Inhibierungsexperiment dadurch äußern müssen, dass durch hohe *K*Gal80-Konzentrationen keine vollständige Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K*Gal1 erreicht werden kann. Die erhaltenen Ergebnisse allerdings las-

sen solch eine starke Konkurrenz nicht erkennen; die Restaktivität von *K/Gal1* liegt bei Anpassung mit der in Absatz 3.2.1 vorgestellten Gleichung jeweils nahe bei Null (unter 5 %) und ist somit vernachlässigbar.

Sofern also eine Selbstinteraktion von *K/Gal80* gegen die Bindung an *K/Gal1* kompetiert (was sich hier andeutet), sollte diese Selbst-Interaktion signifikant schwächer sein als die Interaktion mit *K/Gal1*. Im Zusammenhang mit den in Abschnitt 3.3.3 gezeigten Ergebnissen, welche die Möglichkeit zur Formation eines  $(K/Gal1)_2-(K/Gal80)_2$ -Komplexes offenbaren, deuten die hier vorgestellten Ergebnisse darauf hin, dass nicht die *K/Gal80*-Dimerisierung, sondern die Formation eines *K/Gal80*-Multimers höherer Ordnung (z.B. Tetramer) gegen die Bindung an *K/Gal1* kompetieren könnte.

#### 3.4. Einfluss von Veränderungen an *K/Gal80* auf die Induktion *in vivo*

Die in den folgenden Abschnitten vorgestellten Experimente widmen sich der Frage, inwiefern quantitative Veränderungen an *K/Gal80* die Galaktose-Induktion *in vivo* beeinflussen. Hintergrund dieser Experimente ist wiederum die Fragestellung nach dem Schaltmechanismus des Galaktose-Schalters. In erster Linie sollen hier zwei Modelle unterschieden werden, ein kompetitives und ein nicht-kompetitives. Ein kompetitives Modell besagt, dass der Aktivitätszustand des Galaktose-Schalters durch Konkurrenz zwischen den Interaktionen von *K/Gal80* mit der *K/Gal4*-Aktivierungsdomäne einerseits und *K/Gal1* andererseits bestimmt wird. Unabhängig von den zu Grunde liegenden molekularen Vorgängen sollte ein solches Modell dadurch gekennzeichnet sein, dass relativ geringe Veränderungen der Konzentrationen der Regulatoren und der Parameter der Interaktionen sehr drastische Effekte auf die Aktivität des Galaktose-Schalters haben können. Viele Daten aus *S. cerevisiae* sprechen für ein kompetitives Modell. Die Tatsache zum Beispiel, dass der super-reprimierte Phänotyp, welchen das Allel *Scgal80-s1* hervorruft, durch Kombination mit einem bestimmten *Scgal4*-Allel (*gal4-lle859*) supprimiert werden kann (Salmeron *et al.*, 1990), deutet darauf hin, dass jeweils durch die Mutationen verursachte Affinitätsveränderungen zwischen Gal4 und Gal80 zu den entsprechenden Phänotypen führen. Veränderungen in den Affinitäten zwischen den Regulatoren können somit drastische Effekte auf die Aktivität des Galaktose-Schalters haben.

Den Gegensatz zum kompetitiven Modell bildet ein nicht-kompetitives Modell, nach welchem die Interaktionen zwischen den Regulatoren nicht gegeneinander konkurrieren. Zum Beispiel sollte nach diesem Modell eine verstärkte Affinität zwischen *K/Gal4*-Aktivierungsdomäne und *K/Gal80* nicht die Induktion beeinflussen können. Dieses Modell müsste implizit fordern, dass

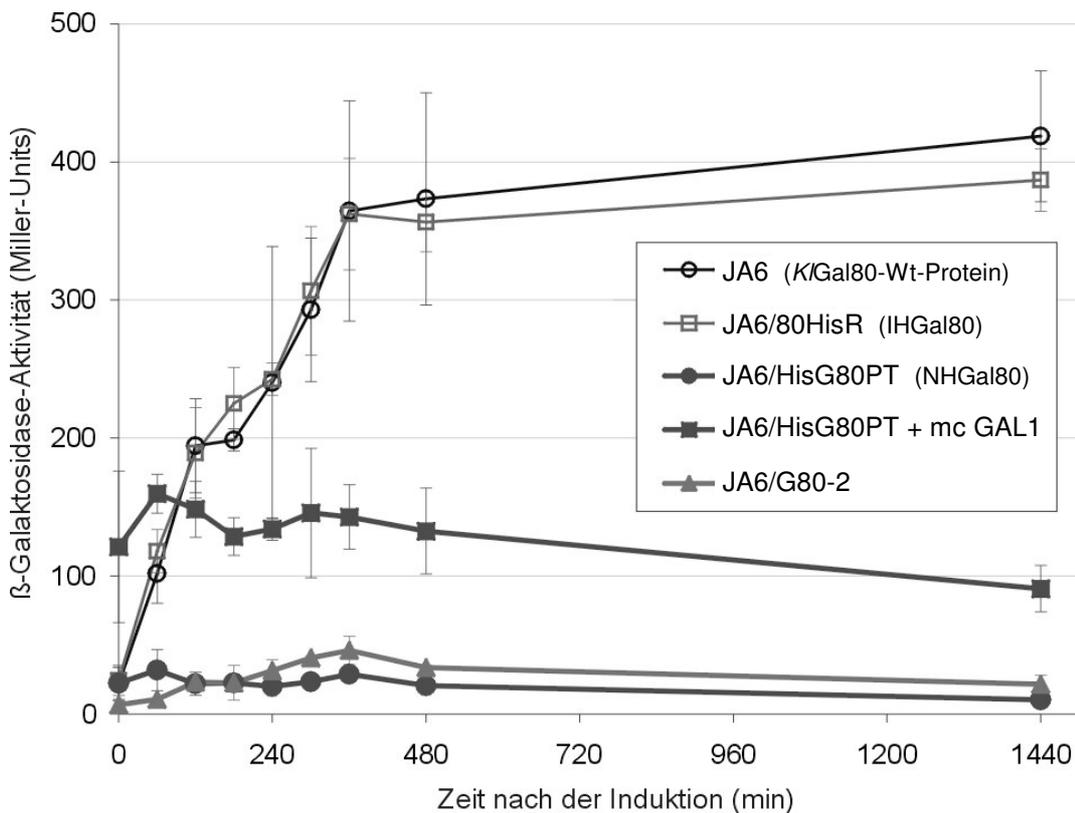
während der Induktion nicht die Aktivierungsdomäne (AD) von *K/Gal4* freigesetzt werden muss (denn dann müsste es eine Konkurrenz gegen die Interaktion zwischen *K/Gal80* und AD geben). Die Aktivierung müsste in diesem Fall durch ein anderes Epitop erfolgen können (z.B. durch Gal1 selbst oder ein durch Gal1-Gal80-Interaktion gebildetes Epitop). Ein solches Modell wäre in Bezug auf Veränderungen der Konzentrationen der Regulatoren und deren Interaktionsparameter relativ unempfindlich.

Mit Hilfe der Inhibierungsexperimente (s. Abschnitt 3.2.3) konnte gezeigt werden, dass *in vitro* eine Konkurrenz zwischen *K/Gal1* und *K/Gal4*-AD um die Bindung an *K/Gal80* vorliegt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* in *K. lactis* ein nicht-kompetitiver Mechanismus zur Aktivierung des Galaktose-Schalters führt. Prinzipiell würde die intrazelluläre Lokalisation der Regulatoren einen solchen Mechanismus zulassen (s. Abschnitt 3.5). Die nachfolgend gezeigten Ergebnisse legen jedoch nahe, dass kleine quantitative Veränderungen an den Regulatoren des Galaktose-Schalters *in vivo* jeweils drastische Phänotypen bewirken können und favorisieren somit eindeutig auch in *K. lactis* einen kompetitiven Mechanismus.

#### 3.4.1. Die Expression der *K/Gal80*-Variante mit verringerter Affinität zu *K/Gal1* in *K. lactis* führt zum vollständigen Ausfall der Galaktose-Induktion

Die ab Abschnitt 3.2.1 vorgestellten Inhibierungsexperimente wurden mit zwei verschiedenen *K/Gal80*-Varianten durchgeführt. Die auf dem Plasmid pETNHG80 codierte N-terminal 6xHis-markierte Variante NHGal80 zeigte dabei eine geringere Affinität zu *K/Gal1* als die intern markierte Variante IHGal80, welche auf dem Plasmid pETIHG80 codiert ist. In Hinsicht auf die Affinitäten zu miniScGal4 und *K/Gal4*-Aktivierungsdomäne (synthetisches Peptid) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden *K/Gal80*-Varianten festgestellt werden (s. Abschnitt 3.2.5).

Durch chromosomale Integration des auf pETNHG80 codierten *GAL80*-Allels in einen *gal80*-defizienten Stamm (hinter den *K/GAL80*-Wildtyppromotor) wurde der Stamm JA6/HisG80PT erhalten (Klose, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Stamm nicht zur Galaktose-Induktion befähigt ist (Klose, 2004; s. auch Abb. 15). Ein Stamm, in welchen das auf dem Plasmid pETIHG80 codierte *GAL80*-Allel eingebracht wurde (JA6/80HisR), zeigt in Bezug auf die Galaktose-Induktion keine signifikante Unterscheidung zum Wildtyp (Abb. 15). Die beiden *K/GAL80*-Allele bedingen also *in vivo* vollkommen verschiedene Phänotypen.



**Abbildung 15.** Einfluss verschiedener *KGal80*-Varianten und der Überexpression von *KGAL80* auf die Galaktose-Induktion. Das *KGAL80*-Wildtypallel des Wildtypstammes JA6 wurde im Stamm JA6/80HisR durch eine chromosomal integrierte Kopie des *KGAL80*-Allels ersetzt, welches für die intern 6xHis-markierte Proteinvariante IHGal80 codiert. Das in JA6/HISG80PT integrierte *KGAL80*-Allel codiert für die N-terminal markierte Variante NHGal80. Die von den Stämmen jeweils exprimierten *KGal80*-Varianten sind in der Legende in Klammern aufgeführt. JA6/G80-2 besitzt zwei chromosomale Kopien des Wildtypallels von *KGAL80*. Mit mcGAL1 ist ein Multikopie-Plasmid zur Überexpression von *KGAL1* (pEAG1) bezeichnet. Die Zellen wurden in SM-Glycerin-Medium (3% Glycerin) über Nacht vorgezogen (im Fall von JA6/HisG80PT+mcGAL1 ohne Uracil). Anschließend erfolgte ein Überimpfen der Zellsuspensionen in frisches Medium gleicher Zusammensetzung (1:10). Nach der Anzucht für weitere 3 Stunden erfolgte der Start der Induktion durch die Zugabe von 2% Galaktose zu den Zellsuspensionen. Die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach der unter 2.14.2 beschriebenen Methode. Die Messwerte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar. Die Standardabweichungen sind an den Messpunkten durch vertikale Balken dargestellt. Im Fall von JA6/G80-2 stellen die Messwerte Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen dar.

Wie in Abb. 15 ersichtlich ist, kann der Phänotyp der Nichtinduzierbarkeit des Stammes JA6/HisG80PT durch Überexpression von *KGAL1* nur partiell supprimiert werden. Der entsprechende Stamm (JA6/HisG80PT+mcGal1) zeigt eine hohe konstitutive Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (ca. 30% der induzierten Expression des Wildtyps). Die hohe *KGal4*-Aktivität unter nicht induzierenden Bedingungen bei Überexpression von *KGAL1* kann auch im Hintergrund des *KGAL80*-Wildtypallels beobachtet werden (Zachariae, 1994) und beruht wahrscheinlich auf einer (schwachen) Interaktion zwischen *KGal1* und *KGal80* (bzw. NHGal80) auch in Abwesenheit von Galaktose. Die Tatsache, dass der Stamm JA6/HisG80PT prinzipiell auf eine Erhöhung der *KGAL1*-Gendosis reagiert, ist ein Indiz dafür, dass die Variante

NHGal80 auch *in vivo* mit *KIGal1* interagieren kann. Die naheliegendste Erklärung für die unterschiedlichen Phänotypen von JA6/HisG80PT und JA6/80HisR ist, unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2, dass der Induktionsdefekt von JA6/HisG80PT auf der verringerten Affinität von NHGal80 zu *KIGal1* beruht. Demnach würde ein drastischer Effekt auf phänotypischer Ebene durch eine moderate Veränderung der Affinität zwischen *KIGal1* und *KIGal80* hervorgerufen.

#### 3.4.2. Die Verdoppelung der Gendosis von *KIGAL80* führt zur Nichtinduzierbarkeit des *GAL*-Regulons

Einen weiteren Einblick in den Schaltmechanismus des Galaktose-Schalters gewährt die Überexpression von *KIGAL80*. Nach chromosomaler Integration einer zusätzlichen Kopie von *KIGAL80* zeigt sich, dass der entsprechende Stamm (JA6/G80-2; Klose, 2004) vollständig die Fähigkeit zur Galaktose-Induktion verliert (s. Abb. 15).

Das Einbringen einer zusätzlichen Kopie des *KIGAL80*-Gens auf einem Centromer-Plasmid bzw. die starke Überexpression von einem Multikopie-Plasmid hatten im Vergleich zum Wildtyp in einer 50%-igen bzw. 80%-igen Verminderung der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in induzierendem Medium resultiert (Zenke, 1995). Möglicherweise hatte in diesen Experimenten ein Verlust an Plasmiden (gemeint ist hier ein Totalverlust in einzelnen Zellen innerhalb der Population) zu der noch relativ starken Genaktivität geführt. Im Vergleich zu diesen (Plasmid-basierten) Experimenten offenbart sich bei chromosomaler Integration von *KIGAL80* ein wesentlich stärkerer Effekt der Überexpression dieses Gens auf die Galaktose-Induktion.

Die in den letzten beiden Abschnitten vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl eine leichte Überexpression von *KIGAL80* als auch (wahrscheinlich) eine leichte Verringerung der Affinität zwischen *KIGal1* und *KIGal80* den vollständigen Verlust der Induzierbarkeit des *GAL*-Regulons zur Folge haben. Die Tatsache, dass drastische Effekte durch relativ leichte Veränderungen hervorgerufen werden können, ist ein Hinweis darauf, dass dem Galaktose-Schalter in *K. lactis* ein kompetitiver Mechanismus zu Grunde liegt.

### 3.5. Die Interaktion zwischen *KIGal1* und *KIGal80* erfolgt im Zellkern

Die intrazellulären Lokalisationen der Regulatoren *KIGal1* und *KIGal80* in *K. lactis* wurden bereits in einigen Vorarbeiten untersucht. *KIGal80* konnte sowohl bei Überexpression (Kapp, 1997) als auch bei Expression von Einzelkopie-Vektor unter Kontrolle des *ScADH1*-Promotors (Hager, 2003) ausschließlich im Zellkern nachgewiesen werden. Die Lokalisation ist unabhängig von der Kohlenstoffquelle (Hager, 2003) und der Anwesenheit von *KIGal1* (Kapp, persönliche Mitteilung). Für *KIGal1* hingegen konnte keine Kompartiment-spezifische Lokalisation festgestellt werden; dieses Protein scheint sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert zu sein (Bürkner, persönliche Mitteilung).

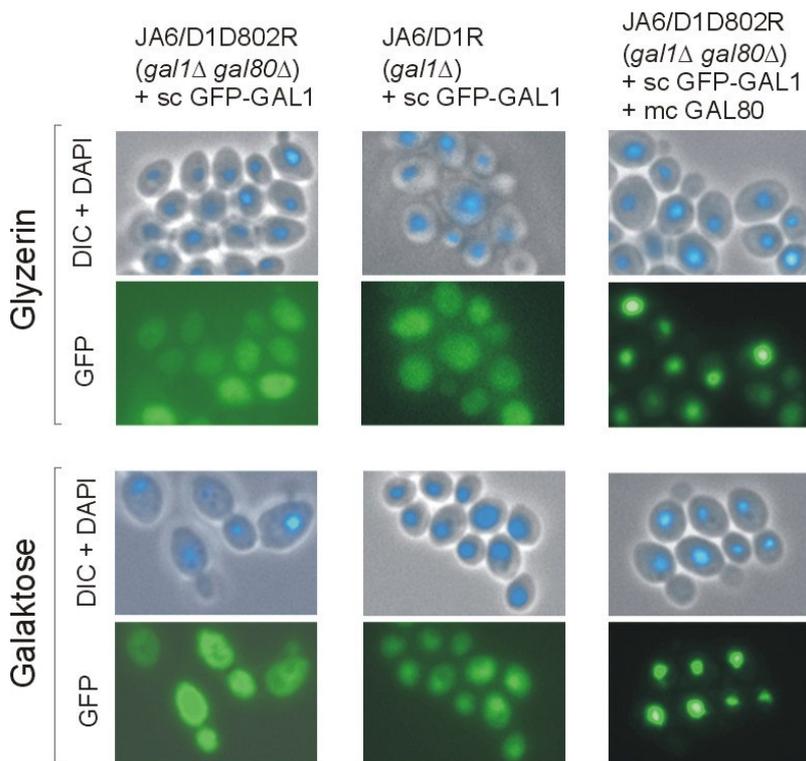
Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Interaktion zwischen *KIGal1* und *KIGal80* im Zellkern stattfindet. Sofern diese Hypothese zutrifft, sollte die Überexpression von *KIGal80* zu einer nukleären Akkumulation von *KIGal1* führen können.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Lokalisation eines GFP-*KIGal1*-Fusionsproteins fluoreszenz-mikroskopisch in verschiedenen Stammhintergründen untersucht. Zu diesem Zweck wurden *Klga1*-defiziente Zellen von *K. lactis* mit einem Einzelkopie-Vektor transformiert, welcher für das GFP-*KIGal1*-Fusionsprotein codiert. Untersuchungen zur Lokalisation dieses Proteins erfolgten in Stammhintergründen mit *Klga80*-Deletion (*gal80Δ*), *KIGAL80*-Wildtypallel und *KIGAL80*-Überexpression (Transformation mit Multikopie-Plasmid pEAG80). Die Anzucht der Zellen erfolgte jeweils unter induzierenden (Galaktose) und nicht induzierenden (Glyzerin) Bedingungen.

In Abb. 16 sind die entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen gezeigt. In Abwesenheit von *KIGal80* (*gal80Δ*) scheint GFP-*KIGal1*, unabhängig von der Kohlenstoffquelle, über die gesamte Zelle gleich verteilt zu sein. In diesem Stammhintergrund konnten weder Kernausschluss noch -akkumulation beobachtet werden. Bei Wachstum unter nicht induzierenden Bedingungen kann diese Beobachtung auch in Zellen des Stammes mit intakter *KIGAL80*-Genkopie gemacht werden. Die Anzucht unter induzierenden Bedingungen führt in diesem Stammhintergrund zu einer leichten Akkumulation von GFP-*KIGal1* im Kern. Sehr deutlich ist die Kernakkumulation bei Überexpression von *KIGAL80* zu erkennen. In diesem Stamm ist bereits nach Wachstum unter nicht induzierenden Bedingungen eine sehr starke Anhäufung von GFP-*KIGal1* im Kern zu beobachten, bei Wachstum unter induzierenden Bedingungen ist dieses Protein ausschließlich im Kern nachweisbar (GFP- und DAPI-Signal überlagern vollständig).

In Übereinstimmung mit der Hypothese konnte somit festgestellt werden, dass die Überexpression von *KIGal80* zu einer Akkumulation von *KIGal1* im Kern führt. Damit konnte die Annahme bestätigt werden, dass die Interaktion dieser beiden Proteine im Kern stattfindet. In Abwesenheit von *KIGal80* konnte kein Kernausschluss von *KIGal1* beobachtet werden; mög-

licherweise kann *K/Gal1* unabhängig von *K/Gal80* in den Kern transportiert werden. Die Tatsache, dass eine nukleäre Akkumulation von *K/Gal1* bei Überexpression von *K/Gal80* auch unter nicht induzierenden Bedingungen erfolgt, ist ein Hinweis darauf, dass *K/Gal1* und *K/Gal80* in der Lage sind, auch unter nicht induzierenden Bedingungen (schwächer als in Anwesenheit von Galaktose) miteinander zu interagieren.

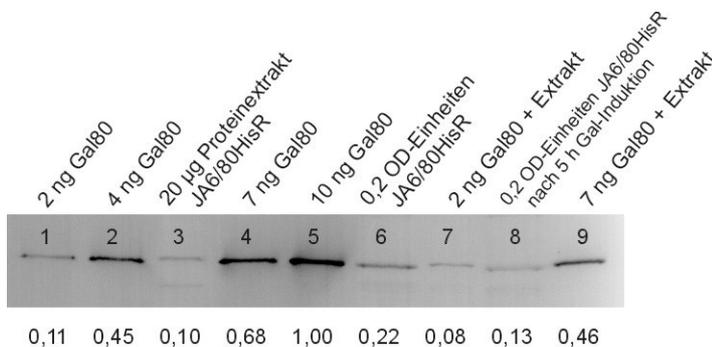


**Abbildung 16.** Intrazelluläre Lokalisation von *K/Gal1*. Ein Centromer-Plasmid, welches für ein GFP-*K/Gal1*-Fusionsprotein codiert [s(single) c(opy) GFP-GAL1 = pCGFPAG1 bzw. pCGFPAG1-ura3 $\Delta$  im Stammhintergrund JA6/D1D802R+mcGAL80], wurde in verschiedene *Kgal1 $\Delta$* -Stämme transformiert. Die Stämme tragen entweder eine *Kgal80*-Deletion (JA6/D1D802R; links), ein Wildtypgen von *K/GAL80* (JA6/D1R; Mitte) oder ein Multikopie-Plasmid [m(ulti) c(opy) GAL80 = pEAG80], welches für *K/Gal80* unter Kontrolle des *ScADH*-Promotors codiert (rechts). Die Zellen wurden über Nacht in selektivem SM-Glycerin- bzw. SM-Galaktose-Medium (jeweils Trp<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>) vorgezogen und nach Überimpfen in frisches Medium gleicher Zusammensetzung (1:15-Verdünnung) für weitere 8 Stunden angezogen. Die Präparation der Zellen ist unter 2.8 beschrieben. Mit Durchlicht erfolgte Aufnahmen sind mit denen zur Detektion der DAPI-Färbung überlagert worden (DIC+DAPI).

### 3.6. Ermittlung der intrazellulären Mengen an *K/Gal1* und *K/Gal80*

Im Hinblick auf das Vorhaben der mathematischen Modellierung des Galaktose-Schalters wurden während der Arbeit die intrazellulären Konzentrationen der Regulatoren *K/Gal1* und *K/Gal80* im induzierten Zustand abgeschätzt. Die Konzentrationen dieser Proteine im nicht-induzierten Zustand, insbesondere jene von *K/Gal80*, sind zu gering für die Detektion. Zur Etablierung eines (Fließ-) Gleichgewichtszustandes (=induzierter Zustand) wurden die Zellen kontinuierlich in Galaktose-haltigem Medium angezogen: nach Wachstum über Nacht erfolgte die Überführung in frisches Medium gleicher Zusammensetzung, aus welchem nach 5 Stunden die Proben zur Auswertung entnommen wurden. Die Bestimmung der *K/Gal1*-

Menge erfolgte durch Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität im Proteinextrakt. Die *K/Gal80*-Menge wurde mittels Westernanalyse ermittelt. Hierzu wurde der Stamm JA6/80HisR benutzt. Dieser besitzt das im Genom integrierte Gen, welches für die Proteinvariante IHGal80 codiert. Wie in Abschnitt 3.4.1 gezeigt wurde, unterscheidet sich dieser Stamm in Hinsicht auf die Galaktose-Induktion nicht vom Wildtyp und ist somit für die Quantifizierung von *K/Gal80* geeignet. In der quantitativen Western-Analyse wurden zwei verschiedene Aufschlussmethoden verglichen. Zum einen wurde Proteinextrakt eingesetzt, welches durch Zellaufschluss mittels Glasperlen hergestellt wurde (s. Abschnitt 2.9.1). Zum anderen wurde Extrakt verwendet, welches durch direkten Aufschluss der Zellen mittels SDS-Lysispuffer erhalten wurde (s. Abschnitt 2.9.2).



**Abbildung 17.** Quantitativer Westernblot zur Ermittlung der intrazellulären *K/Gal80*-Konzentration in induzierten Zellen. In SM-Galaktose-Medium (2% Galaktose) über Nacht vorgezogene Zellen der Stämme JA6 und JA6/80HisR wurden durch Verdünnung (1:15) in frisches Medium gleicher Zusammensetzung überführt. Nach 5 h wurde ein Teil der Zellen direkt in SDS-Lysispuffer lysiert (s. 2.9.2). Die restlichen Zellen wurden geerntet und mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen (s. 2.9.1). Die Proben

wurden nach Auftrennung durch ein 10%-iges SDS-PAA-Gel durch Westernanalyse untersucht. Die Detektion des intern 6xHis-markierten *K/Gal80* erfolgte mit Hilfe von Anti-Penta-His Antikörper (Qiagen). Spuren 1,2,4 und 5 enthalten gereinigtes *K/Gal80* (IHGal80), Spuren 7 und 9 gereinigtes *K/Gal80*, welchem Proteinextrakt aus JA6 (20 µg Protein) beigemischt wurde. In Spur 3 wurden 20 µg des Proteinextraktes aus JA6/80HisR aufgetragen. Spur 6 enthält Extrakt aus direkt in SDS-Lysispuffer aufgeschlossenen Zellen dieses Stammes, entsprechend einer Zellmenge von 0,2 OD-Einheiten. In Spur 8 ist Extrakt (0,2 OD-Einheiten) aus Zellen des Stammes JA6/80HisR aufgetragen, welche nach kontinuierlichem Wachstum in SM-Glyzerin-Medium (über Nacht und nach Überimpfen in frisches Medium für 5 weitere Stunden) durch die Zugabe von 2% Galaktose für 5 h induziert wurden. Die Signale wurden nach Digitalisierung des Westernblots durch Scannen mit Hilfe des Programmes Image Master 2D Platinum, Version 5.0 (Amersham Biosciences) quantifiziert. Die relativen Signalstärken der Banden sind unterhalb des Westernblots aufgeführt.

Abb. 17 zeigt die Western-Analyse, welche quantitativ ausgewertet wurde. Als Mengenstandards wurden gereinigtes IHGal80 und Proteinextrakt aus dem Wildtyp-Stamm JA6 mit beigemengtem gereinigtem IHGal80 aufgetragen. Die Berechnungen der *K/Gal80*-Mengen in den Extrakten aus JA6/80HisR erfolgten unter Zuhilfenahme einer linearen Regression mit den Mengenstandards, welchen Extrakt aus JA6 beigemischt war (Benutzung der Mengenstandards ohne Beimengung von Proteinextrakt führt zu einem 1,5-fach niedrigeren Wert für die *K/Gal80*-Mengen). Von dem mittels Glasperlen-Aufschluss erhaltenen Extrakt aus JA6/80HisR wurde eine definierte Menge an Protein in der Western-Analyse eingesetzt. Die

berechnete *K/Gal80*-Menge bezieht sich in diesem Fall daher auf die Gesamtproteinmenge. Von der mittels SDS-Lysispuffer aufgeschlossenen Probe hingegen wurde eine definierte Menge an Zellen eingesetzt, welche durch Messung der optischen Dichte der Zellkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt wurde. Die Konzentration von *K/Gal80* bezieht sich in diesem Fall auf die Zellmenge (1 OD-Einheit entspricht der Menge von 1 ml Zellkultur mit  $OD_{600}=1$ ).

Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tab. 2 aufgeführt. Erläuterungen zur Berechnung der *K/Gal80*-Konzentration bzw. -Menge innerhalb einer Zelle bzw. eines Zellkerns finden sich in Abschnitt 2.15.3. Die beiden verwendeten Methoden des Zellaufschlusses lieferten sehr ähnliche Ergebnisse. Rein rechnerisch ergab sich ein Wert von ca. 3000 Molekülen *K/Gal80* innerhalb einer Zelle, was im Zellkern bei Annahme eines Kernvolumens von 2 fL (Kernvolumen von *S. cerevisiae*; Winey *et al.*, 1997) einer Konzentration von ca. 2,5  $\mu\text{M}$  entspricht. Eine quantitative (densitometrische) Auswertung erfolgte lediglich anhand der abgebildeten Western-Analyse. Mit zwei weiteren durchgeführten Western-Analysen erfolgte eine visuelle Abschätzung der *K/Gal80*-Menge (Daten nicht gezeigt). Bei Hinzuziehen dieser Daten liegt die *K/Gal80*-Konzentration innerhalb des Kerns in einem Bereich von ca. 2 – 4  $\mu\text{M}$ .

**Tabelle 2.** *K/Gal80*-Menge\* in induzierten Zellen

Aufschlussmethode	[ <i>K/Gal80</i> ] im Extrakt	[ <i>K/Gal80</i> ] im Kern ( $\mu\text{M}$ )	<i>K/Gal80</i> -Moleküle/Zelle
Glasperlen	0,11 ng/ $\mu\text{g}$ Protein	2,6	3176
SDS-Lysispuffer	19,2 ng/ OD-Einheit	2,4	2884

\* Die Ergebnisse basieren auf der in Abb. 17 dargestellten Western-Analyse.

Die Proteinextrakte, welche zur Durchführung der in Abb. 17 dargestellten Western-Analyse verwendet wurden, dienten zugleich der Bestimmung der *K/Gal1*-Konzentration innerhalb einer Zelle. Zu diesem Zweck wurde die Galaktokinase-Aktivität im Zellextrakt bestimmt (JA6: 425 mU/mg; JA6/80HisR: 410 mU/mg). Durch Kenntnis der Aktivität des gereinigten Enzyms (s. Abschnitt 3.1.2:  $k_{\text{cat}}$  von  $70 \text{ s}^{-1}$  für NHGal1 entspricht bei Wildtyp-*K/Gal1* mit 55,8 kDa einer Aktivität von ca. 75 U/mg) kann die Konzentration von *K/Gal1* im Zellextrakt abgeschätzt werden. Diese beträgt ca. 5,6 ng/ $\mu\text{g}$  Protein. Nach der in Abschnitt 2.15.3 vorgestellten Berechnungsmethode und unter der Annahme einer Gleichverteilung von *K/Gal1* über die gesamte Zelle entspricht das einer intrazellulären Konzentration (Zellvolumen: 22,6 fL; Anders, 2000) von ca. 11  $\mu\text{M}$  bzw. der Menge von ca. 150.000 Molekülen pro Zelle.

### 3.7. Der Galaktose-Schalter aus mathematischer Sicht

Die in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass der Mechanismus, welcher dem Galaktose-Schalter in *K. lactis* zu Grunde liegt, auf der Konkurrenz zwischen der Aktivierungsdomäne von Gal4 (Gal4-AD) und Gal1 um die Bindung an Gal80 beruht. Das grundlegende Prinzip dieses Schalters ist intuitiv einfach nachvollziehbar: Im nicht-induzierten Zustand (Schalter ist „aus“) ist die Gal4-AD durch Gal80 gebunden, im induzierten Zustand (Schalter ist „an“) ist die Gal4-AD frei („frei“ im Sinne von „nicht an Gal80 gebunden“). Die Veränderung der Affinität zwischen Gal1 und Gal80 ermöglicht ein Umschalten zwischen diesen beiden Zuständen. Die Regulation der Affinität zwischen Gal1 und Gal80 erfolgt durch Galaktose selbst; die Anwesenheit von Galaktose führt zu einer verstärkten Bindung zwischen Gal1 und Gal80 und damit zur Möglichkeit der Befreiung der Gal4-AD von Gal80.

Bei genauerer (quantitativer) Betrachtung dieses Modells zeigen sich jedoch bereits an dieser Stelle Probleme. Zum einen offenbaren die Ergebnisse der Inhibierungsexperimente, dass die apparente Affinität zwischen Gal1 und Gal80 (in Anwesenheit von Galaktose) wesentlich geringer ist als die zwischen Gal4 und Gal80. Damit stellt sich die Frage, inwiefern die relativ schwache Gal1-Gal80 Interaktion effektiv gegen die sehr starke Gal4-Gal80 Bindung kompetieren kann. Noch unverständlicher wird diese Gegebenheit im Zusammenhang mit der Tatsache, dass Gal80 während des Induktionsvorganges stark induziert, dessen Konzentration also stark erhöht wird (Zenke, 1993).

Ein Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe der mathematischen Modellierung zu untersuchen, inwiefern sich unter den beschriebenen Voraussetzungen ein effektiver Schaltmechanismus verwirklichen lässt. Der Begriff „effektiv“ bedeutet hier, inwiefern und in welchem Ausmaß das Ausgangssignal des Schalters (bei vorgegebenen Eingangsgrößen) zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand variieren kann. Dem liegt die Annahme zu Grunde, dass ein „guter“ Schalter in der Lage sein sollte, einen möglichst großen quantitativen Unterscheid zwischen den zwei betrachteten Zuständen zu erzeugen. Dies ermöglicht für den Fall der Regulation von Genen einen möglichst starken Expressionsunterschied der entsprechenden Gene zwischen zwei verschiedenen Zuständen. Es gibt eine Reihe von Faktoren, welche den Unterschied zwischen zwei Zuständen (nicht-linear) verstärken können. Hierzu zählen zum Beispiel Veränderungen der Chromatinstruktur (z.B. zur Stabilisierung des reprimierten Zustandes) oder die Möglichkeit der Reinitiation nach einmal erfolgreich eingeleiteter Transkription (s. z.B. Struhl, 1996; Yudkovsky *et al.*, 2000) zur Stabilisierung des induzierten Zustandes. Dennoch soll hier in erster Annäherung ausschließlich der Galaktose-Schalter, bestehend aus seinen drei basalen Komponenten (Gal4, Gal80 und Gal1), betrachtet wer-

den. Damit soll erörtert werden, inwiefern dieser Schalter isoliert betrachtet zu einem effektiven Umschalten zwischen den zwei betrachteten Zuständen (nicht-induzierter und induzierter Zustand) beitragen kann.

Im Folgenden werden zwei mathematische Modelle vorgestellt, welche die Interaktionen der Komponenten des Galaktose-Schalters mit Hilfe von Gleichgewichtsmodellen abbilden. Die Modelle wurden bewusst einfach gehalten, um grundlegende Prinzipien erkennbar und durchschaubar werden zu lassen. Beide Modelle basieren auf einem kompetitiven Mechanismus, unterscheiden sich aber in der Detailliertheit der formulierten Interaktionen. Das einfachere Modell entspricht in seinem Verhalten eher den intuitiven Erwartungen, das komplexere der beiden Modelle zeigt zum Teil unerwartete Ergebnisse. Wie nachfolgend gezeigt wird, lässt sich auf der Basis des komplexeren Modells auch unter der oben beschriebenen Ausgangssituation ein effizienter Schalter verwirklichen.

### 3.7.1. Grundlegende Modellannahmen

Im Folgenden werden die grundlegenden Annahmen der beiden mathematischen Modelle aufgeführt. Zum Teil basieren diese Annahmen auf Ergebnissen, welche in vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit vorgestellt wurden.

i ) Dem Galaktose-Schalter liegt ein kompetitiver Mechanismus zu Grunde. Die in den Abschnitten 3.2.3 und 3.2.4 vorgestellten Ergebnisse der Galaktokinase-Inhibierungsexperimente zeigen, dass eine Konkurrenz zwischen *K/Gal1* und der Aktivierungsdomäne von Gal4 um die Bindung an *K/Gal80* besteht. Zur mathematischen Beschreibung wurde ein auf direkter Konkurrenz beruhendes reines Dissoziationsmodell (ohne allosterische Transformation) gewählt, welches verlangt, dass sich die Bindungen von Gal1 und Gal4 an Gal80 gegenseitig ausschließen.

ii) Die apparenten Affinitäten zwischen den Regulatoren sind auf der Basis der Galaktokinase-Inhibierungsexperimente ermittelt worden (s. Tab. 1 und Abschnitt 3.2.5). Für die Quantifizierung der *K/Gal4-K/Gal80*-Interaktion wurden die mit der Variante miniScGal4 erhaltenen Ergebnisse zu Grunde gelegt. Der mittlere  $K_{D,app}$  für die Gal4-Gal80 Interaktion beträgt demnach 1 nM. Zur Quantifizierung der Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 wurde in den mathematischen Modellen der mittlere  $K_{D,app}$ -Wert verwendet, welcher bei Messungen mit der Variante IHGal80 in Anwesenheit von 100 mM KAc erhalten wurde ( $K_{D,app} = 83$  nM).

iii) *K/Gal80* ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Kapp, 1997; Hager, 2003; diese Arbeit Abschnitt 3.5). *K/Gal1* befindet sich sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus, die Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* erfolgt im Nukleus (s. Abschnitt 3.5). Demzufolge wird in dem mathematischen Modell lediglich der Nukleus betrachtet (bzw. die in ihm vorhandenen Konzentrationen und stattfindenden Interaktionen).

iv) Die intrazellulären Mengen der Regulatoren *K/Gal1* und *K/Gal80* im induzierten Zustand wurden durch Enzymmessung bzw. Western-Analyse abgeschätzt (s. Abschnitt 3.6). Die Unterschiede in der Kompartimentierung wurden bei der Berechnung der Konzentrationen der Regulatoren im Nukleus berücksichtigt. Nach diesen Berechnungen liegt die Konzentration von *K/Gal80* im induzierten Zustand im Kern zwischen 2 und 4  $\mu\text{M}$ . Bei Annahme einer Induktion von *K/Gal80* um den Faktor 20, ein Wert, welcher durch Messungen mit einem *K/GAL80*-GUS-Reporterkonstrukt (pC80GUS; s. Abschnitt 3.8 und Zenke *et al.*, 1993) ermittelt wurde, beträgt die Konzentration von *K/Gal80* im nicht-induzierten Zustand ca. 100 - 200 nM. Die intrazelluläre Konzentration von *K/Gal1* im induzierten Zustand beträgt ca. 11  $\mu\text{M}$ . Bei Annahme einer Gleichverteilung über die gesamte Zelle entspricht dies somit auch der Konzentration im Nukleus. Zur Vereinfachung wird hier angenommen, dass die Gesamtkonzentration von *K/Gal1* im Kern durch die Interaktion mit *K/Gal80* nicht beeinflusst wird, dass also kein Ausgleich der Konzentrationen an freiem Gal1 zwischen Kern und Cytoplasma stattfindet.

v) Die Konzentration von Gal4 ist in *K. lactis* nicht bestimmt worden. Aus diesem Grund wurden für das Modell Angaben zu Grunde gelegt, welche zur Bäckerhefe *S. cerevisiae* gemacht wurden. In Kodadek (1994) ist die Angabe zu finden, dass in *S. cerevisiae* auf nicht reprimierendem Medium ca. 50-100 ScGal4 Dimere pro Zelle vorliegen. Dies entspricht im Zellkern ( $V = 2 \text{ fl}$ ; Winey *et al.*, 1997) einer Monomer-Konzentration von 80-170 nM. In den mathematischen Modellen wurde für *K. lactis* eine Konzentration von 80 nM für *K/Gal4* im nicht-induzierten Zustand angenommen. Dies entspricht ungefähr der berechneten Konzentration an *K/Gal80* im nicht-induzierten Zustand (s. oben), was somit theoretisch eine Absättigung (komplette Repression) von *K/Gal4* mit *K/Gal80* ermöglicht. In *K. lactis* ist Gal4 autoregulierte, die Expression auf Galaktose-haltigem Medium wird um den Faktor 2-3 induziert. (Zachariae und Breunig, 1993). Für die Modellierung wurde eine Induktion um den Faktor 2,5 angenommen. Im induzierten Zustand beträgt die Konzentration von *K/Gal4* demnach 200 nM.

### 3.7.2. Vorgehen bei der Simulation und Definitionen

Die mathematischen Modelle stellen Gleichgewichtsmodelle dar und gestatten somit nicht die Simulation des Induktionsvorganges (dieser ist dynamisch und kann nur auf der Basis eines dynamischen Modells abgebildet werden). In den Modellen selbst werden lediglich die Interaktionen zwischen den Regulatoren des Galaktose-Schalters (Gal4, Gal80 und Gal1) abgebildet. Sie ermöglichen somit nach Vorgabe der Gesamtkonzentrationen der Proteine (z.B.  $X_0$  und  $Y_0$ ) die Berechnung der Konzentrationen an Komplexen (XY) und freien Proteinen (X und Y).

Beide Modelle basieren auf dem reinen Dissoziations-Mechanismus. Die Bildung von Komplexen, welche Gal4, Gal80 und Gal1 zugleich enthalten, ist somit nicht möglich. Den Modellen liegt die Annahme zu Grunde, dass lediglich freies (nicht an Gal80 gebundenes) Gal4 zur Transkriptionsaktivierung befähigt ist. Entsprechend dient als Output der Simulationen (als Maß für die Aktivität des Schalters) die Menge an freiem Gal4, nachfolgend auch als „aktives“ Gal4 bezeichnet.

Nach folgendem Schema wurden die Simulationen jeweils durchgeführt: Es wurden jeweils zwei Zustände, entsprechend dem „nicht-induzierten“ und dem „induzierten“, simuliert. Diese beiden Simulationen unterschieden sich durch die Vorgaben verschiedener Konzentrationen der Regulatoren, entsprechend den im vorigen Abschnitt aufgeführten Annahmen. Die Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 im nicht-induzierten Zustand wurde vernachlässigt, was durch Setzen der Gal1-Konzentration auf Null erreicht wurde. Für die Gal1-Gal80-Interaktion im induzierten Zustand wurde angenommen, dass Gal1 mit Galaktose (und ATP) abgesättigt ist, dass also sämtliche Gal1-Moleküle zur Interaktion mit Gal80 (mit  $K_D=83$  nM) befähigt sind. Die Simulationen der beiden Zustände ermöglichen jeweils die Berechnung der Konzentration von aktivem Gal4.

Als Maß für die Aktivitätssteigerung des Schalters zwischen diesen beiden Zuständen wurde hier der Begriff der „Schalter-Effizienz“ eingeführt (adäquat zum Begriff der „Induktionsstärke“). Sie wurde definiert als das Verhältnis der absoluten Konzentrationen von aktivem Gal4 im induzierten zu aktivem Gal4 im nicht-induzierten Zustand. Aus dieser Definition geht hervor, dass die Schalter-Effizienz durch Erhöhung der absoluten Konzentration von Gal4 im induzierten Zustand erhöht werden kann, ohne dass dabei der Anteil von aktivem Gal4 bezogen auf die Gal4-Gesamtkonzentration gesteigert würde. Diese Annahme ist gerechtfertigt für den Fall, dass die Konzentration an Gal4 in der Zelle limitierend ist, dass also z.B. die Promotoren der *GAL*-Gene (im nicht-induzierten Zustand) nicht mit Gal4 gesättigt sind. In diesem Fall würde eine Konzentrationserhöhung von Gal4 eine stärkere Besetzung der Pro-

motoren bewirken und damit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zur Aktivierung der entsprechenden Gene (ohne dass der Anteil von aktivem Gal4 in Bezug auf die Gal4-Gesamtkonzentration gesteigert würde). Zumindest für *K. lactis* scheint diese Annahme gerechtfertigt zu sein. Wird die Autoinduktion von *K/GAL4* verhindert, so äußert sich dies in einer 20-70%-igen Verminderung der Induktion der *GAL*-Gene (Stamm JA6/L92XR; Zachariae, 1993). Dies zeigt, dass eine Veränderung der absoluten Konzentration von *K/Gal4* *in vivo* einen Einfluss auf die Induktionsstärke (entsprechend auf die Schaltereffizienz) hat. Besonders deutlich erkennbar ist der Einfluss der absoluten *K/Gal4*-Konzentration in *gal80Δ*-Stämmen. Ein Stamm, welcher neben dem veränderten (nicht zur Autoregulation befähigten) *K/GAL4*-Allel eine *K/gal80*-Deletion trägt (JA6/XRD802; Zachariae, 1994), zeigt im Vergleich zum Stamm mit *K/gal80*-Deletion und *K/GAL4*-Wildtypallel (JA6/D802; Zenke *et al.*, 1993) eine um 50% verminderte (konstitutive) Expression der  $\beta$ -Galaktosidase (Zachariae, 1994). Dies zeigt sehr deutlich, dass die *K/Gal4*-Konzentration *in vivo* (sogar bei Abwesenheit des Inhibitors *K/Gal80*) für die Induktionsstärke des *GAL*-Regulons limitierend ist. Die Induktionsstärke kann somit durch Zunahme der absoluten Gal4-Konzentration gesteigert werden (trotz gleich bleibender relativer Menge von aktivem Gal4 bezogen auf die Gal4-Gesamtkonzentration).

Die Schalter-Effizienz ist ein Maß für die Aktivitätssteigerung des Galaktose-Schalters zwischen den beiden simulierten Zuständen (induzierter und nicht-induzierter Zustand). Hier stellt sich die Frage, welche Schalter-Effizienz ein „effektiver“ Galaktose-Schalter erreichen sollte. Bei Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen der Aktivität des Schalters und der Transkriptionsaktivität eines *GAL*-Genes entspricht die Schalter-Effizienz der Induktion dieses Genes (vom nicht-induzierten zum induzierten Zustand) auf mRNA-Ebene. Derartige quantitative Messungen wurden für *K. lactis* nur bedingt durchgeführt. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle die Induktion auf Ebene der mRNA aus der Induktion auf Proteinebene abgeleitet werden. Dabei folge ich der Argumentation nach Fell (2001) und Verma *et al.* (2003).

Die Induktion von *LAC4* ( $\beta$ -Galaktosidase), eines sehr häufig verwendeten Reporters zur Quantifizierung der Aktivität des *GAL*-Regulons, erfolgt auf Proteinebene (Messung durch Enzymaktivität) bei Wechsel von nicht induzierendem (z.B. Glycerin) zu induzierendem (Galaktose) Medium um einen Faktor von ca. 20-30 (s. dazu z.B. Zenke *et al.*, 1993; Zachariae, 1994 und diese Arbeit Abb. 15). Die Induktion der Proteine *K/Gal1* und *K/Gal80* erfolgt mit einer ähnlichen Stärke (s. z.B. Messungen mit dem *K/GAL80-GUS*-Reporterkonstrukt in Abschnitt 3.8). Für *S. cerevisiae* wurde ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen der Induktion auf mRNA- und Proteinebene beschrieben (Fell, 2001). Der Autor beschreibt den Zusammenhang zwischen Protein- und mRNA-Induktion ( $f_P$  bzw.  $f_R$ ) durch einen „Co-Response“-Koeffizienten  $x$ , wobei gilt:  $f_P = f_R^x$ . Bei Betrachtung aller von Ideker *et al.* (2001)

zur Verfügung gestellten Transkriptom- und Proteomdaten ergibt sich für  $x$  ein Wert von ca. 0,3 (Fell, 2001). Der „Co-Response“-Koeffizient für die *GAL*-Gene aus *S. cerevisiae* wurde bei Verma *et al.* (2003) mit 0,5 angegeben. Das bedeutet, dass der Anstieg eines typischen *GAL*-Proteins um einen Faktor 10 (20, 30) den Anstieg der entsprechenden mRNA um einen Faktor 100 (400, 900) voraussetzt. Dieser Argumentation folgend sollte die Schalter-Effizienz eines „effektiven“ Schalters somit ungefähr Werte zwischen 400 und 1000 erreichen können.

### 3.7.3. Modell Nummer 1: Das naive Modell

Das erste (naive) Modell des Galaktose-Schalters bildet einen reinen Dissoziations-Mechanismus in seiner einfachsten Form ab. Hierzu wurde das Modell benutzt, welches zur Simulation (und Parameterschätzung) der erweiterten Inhibierungsexperimente (mit miniSc-Gal4 und synthetischem Peptid) verwendet wurde (s. Abschnitt 3.2.5 und Abb. 8). Dieses Modell betrachtet die drei Regulatoren lediglich als abstrakte Entitäten, deren Interaktionen mit den in den Inhibierungsexperimenten ermittelten apparenten Affinitäten stattfinden.

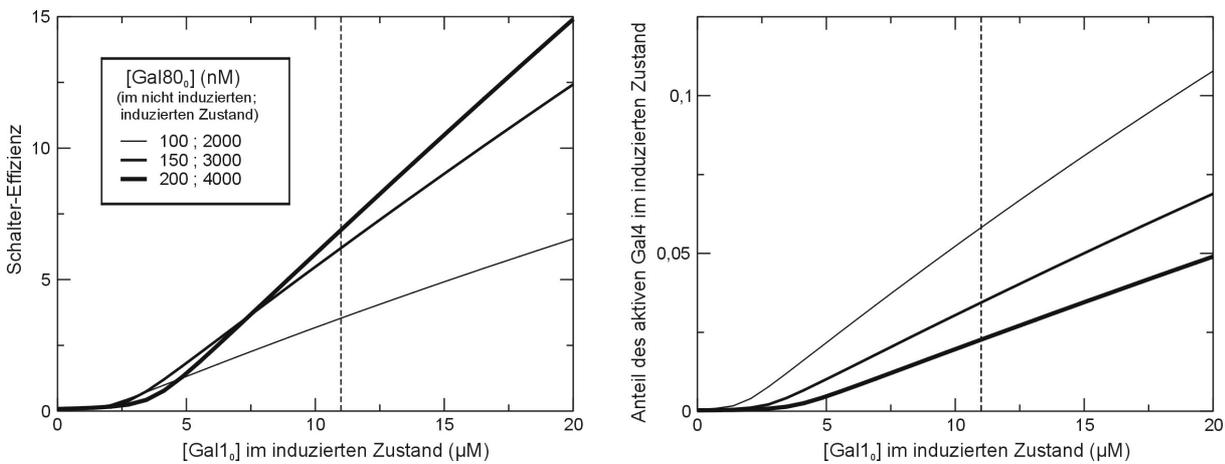
Die Simulationen wurden wie oben beschrieben durchgeführt, die entsprechenden Simulationsergebnisse mit diesem Modell sind in Abb. 18 dargestellt. In dieser Abbildung sind die Ergebnisse von Simulationen mit drei verschiedenen Gal80<sub>0</sub>-Konzentrationen, welche den durch die Westernanalysen abgeschätzten Bereich abdecken, dargestellt. Die Simulationen erfolgten jeweils für verschiedene Konzentrationen von Gal1<sub>0</sub> (im induzierten Zustand), die Ergebnisse sind in Abhängigkeit von der Gal1<sub>0</sub>-Konzentration dargestellt. Neben der im letzten Abschnitt vorgestellten Schalter-Effizienz zeigt die Abbildung den Anteil an aktivem (nicht an Gal80 gebundenem) Gal4 bezogen auf die Gal4-Gesamtkonzentration im induzierten Zustand ( $=Gal4/Gal4_0$ ).

Die Simulationsergebnisse lassen deutlich erkennen, dass der Schalter auf der Basis des verwendeten einfachen Modells unter den gegebenen Annahmen sehr ineffizient operiert. Bei Annahme einer Gal1-Konzentration von ca. 11  $\mu$ M beträgt die Induktionsstärke (Schalter-Effizienz) in den hier gezeigten Simulationen, abhängig von der vorgegebenen Gal80<sub>0</sub>-Konzentration, ca. 3-7. Unter induzierenden Bedingungen kann nur ein Bruchteil des gesamten Gal4 (ca. 2-5% bei 11  $\mu$ M Gal1; s. Abb. 18) vom inhibitorischen Einfluss des Gal80 Proteins befreit werden.

Ein auf dem hier vorgestellten Modell basierender Galaktose-Schalter wäre also sehr ineffizient, sowohl in Hinsicht auf die Induktionsstärke als auch die Befreiung des Gal4-Proteins bzw. dessen Aktivierungsdomäne von Gal80 (gemeint ist der Anteil an aktivem Gal4 im induzierten Zustand).

## Schalter-Effizienz

## Anteil des aktiven Gal4



**Abbildung 18.** Simulationen mit dem naiven Modell. Dargestellt sind Schalter-Effizienz (links) und der Anteil an aktivem Gal4 im induzierten Zustand (rechts) in Abhängigkeit von der Gal1<sub>0</sub>-Konzentration. Die Schalter-Effizienz ergibt sich als Verhältnis von aktivem Gal4 zwischen induziertem und nicht-induziertem Zustand. Der Anteil des aktiven Gal4 ist bezogen auf die Gesamtkonzentration von Gal4. Die Wahl der Konzentrationen und Parameterwerte ist im Text erläutert. Es wurden jeweils drei Simulationen mit verschiedenen Gal80<sub>0</sub>-Konzentrationen durchgeführt. Diese Konzentrationen decken den Bereich ab, welcher durch Westernanalysen abgeschätzt wurde. Bei einer Gal1<sub>0</sub>-Konzentration von ca. 11 µM (markiert durch gestrichelte Linie), was der durch Enzymmessungen abgeschätzten Konzentration entspricht, ergibt sich unter den gewählten Bedingungen eine Schalter-Effizienz zwischen 3 und 7. Der Anteil von aktivem Gal4 im induzierten Zustand (bezogen auf die Gesamtkonzentration von Gal4) liegt hierbei zwischen 2 und 6%.

Im Folgenden soll ein Eindruck davon vermittelt werden, inwiefern die Wahl der Parametergrößen die Ergebnisse der Simulationen mit dem Modell beeinflusst und durch welche Annahmen die Schalter-Effizienz gesteigert werden kann. Sämtliche Parameterwerte des Modells wurden zu diesem Zweck jeweils um  $-30\%$  und  $+30\%$  um deren experimentell bestimmte (bzw. nach Abschnitt 3.7.1 angenommene) Werte verändert. Für jeden Parameter ergeben sich somit drei Werte (Mittelwert  $m$ ;  $m-0,3\cdot m$ ;  $m+0,3\cdot m$ ). Die Simulationen wurden mit allen sich daraus ergebenden Kombinationen durchgeführt ( $3^7$  Kombinationen bei der Anzahl von 7 Parametern). In Tab. 3 sind die variierten Parameter und deren experimentell bestimmte bzw. angenommene Werte (Mittelwerte, um die variiert wurde) aufgeführt.

Die Simulationen wurden ähnlich zu den vorher beschriebenen durchgeführt. Mit jedem Parametersatz wurden wiederum jeweils zwei Zustände („nicht-induzierter“ und „induzierter“) simuliert. Die zur Simulation des induzierten Zustandes vorgegebenen (mittleren) Konzentrationen der Regulatoren sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Ausgehend von diesen Konzentrationen (bzw. den um  $-30\%$  oder  $+30\%$  variierten) wurden mit Hilfe der Faktoren, welche die Induktionsstärken der Regulatoren (Gal4 und Gal80) quantifizieren, die Konzentrationen von Gal4 und Gal80 zur Simulation des nicht-induzierten Zustandes berechnet. Die Konzentration von Gal1 wurde zur Simulation des nicht-induzierten Zustandes wiederum auf Null gesetzt. Analog zur vorher beschriebenen Vorgehensweise wurden so zu jedem Parametersatz

Schalter-Effizienz und Anteil an aktivem Gal4 (bezogen auf die Gal4-Gesamtkonzentration) im induzierten Zustand berechnet.

**Tabelle 3.** Variierte Parameter des Modells

Parameter	Mittelwert*
$K_D$ für Gal1-Gal80-Interaktion	83 nM
$K_D$ für Gal4-Gal80-Interaktion	1 nM
Stärke der Induktion von Gal80	20
Stärke der Induktion von Gal4	2,5
Gal4 <sub>0</sub> im induzierten Zustand	200 nM
Gal1 <sub>0</sub> im induzierten Zustand	11.000 nM
Gal80 <sub>0</sub> im induzierten Zustand	2.500 nM

\* Wert, um den die Parameter in den Simulationen variiert wurden

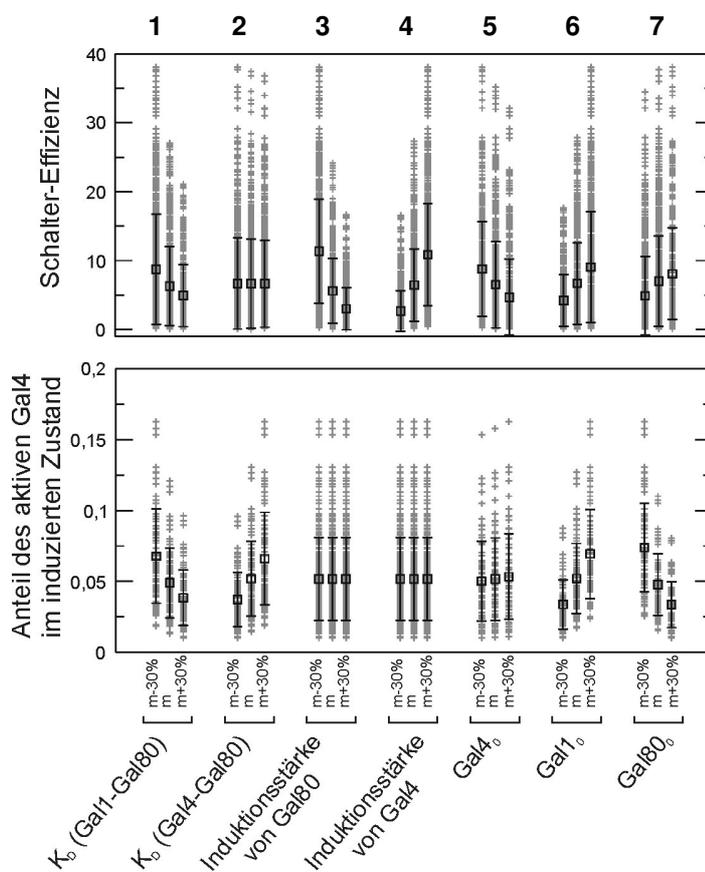
In Abbildung 19 sind die entsprechenden Ergebnisse der Simulationen dargestellt. Die Ergebnisse wurden gruppiert nach den Parametern und verwendeten Parameterwerten. Dies ergibt 7 Obergruppen für die Parameter mit jeweils 3 Untergruppen für die Werte der entsprechenden Parameter. Somit kann die Abbildung einen Eindruck davon vermitteln, welche Auswirkungen die Variation einzelner Parameter auf die Simulationsergebnisse hat. Unter anderem geht daraus hervor, welche Parameterwerte (in Kombination miteinander) notwendig sind, um eine möglichst hohe Schalter-Effizienz zu erreichen (man betrachte hierzu, in welcher Untergruppe der jeweiligen Obergruppe die Maxima der Schaltereffizienz liegen). Soll zum Beispiel die höchstmögliche Schalter-Effizienz von annähernd 40 erreicht werden, so muss dazu i) der  $K_D$  der Gal1-Gal80-Interaktion niedrig, ii) die Induktionsstärke von Gal80 niedrig, iii) die Induktionsstärke von Gal4 hoch und iv) die Gal1-Konzentration hoch sein (Spalten 1,3,4 und 6 in Abb. 19). Setzt man einen dieser Parameter auf den experimentell bestimmten Wert, so fällt die Schalter-Effizienz jeweils auf unter 30. Die Veränderung des  $K_D$ -Wertes der Gal4-Gal80-Interaktion hingegen hat keinen großen Einfluss auf die Schalter-Effizienz.

Die starke Abhängigkeit der Schalter-Effizienz von der Induktionsstärke von Gal4 beruht zum größten Teil auf der Definition der Schaltereffizienz: hierbei gehen die absoluten Konzentrationen von aktivem Gal4 ein, eine Erhöhung der Schalter-Effizienz kann somit ohne Steigerung des Anteils von aktivem Gal4 bezogen auf die Gal4-Gesamtkonzentration durch bloße Erhöhung der absoluten Gal4-Konzentration erreicht werden.

Die Abhängigkeit der Schalter-Effizienz von den anderen erwähnten Parametern entspricht weitestgehend der Intuition. Eine hohe Konzentration von Gal1 im induzierten Zustand sowie

eine hohe Affinität zwischen Gal1 und Gal80 verstärken die Bildung des Gal1-Gal80-Komplexes im induzierten Zustand und führen somit über eine verstärkte Freisetzung von Gal4 (im induzierten Zustand) zu einer höheren Schalter-Effizienz [s. Abb. 19 Spalten 1 und 6; die Wirkung dieser Parameter auf Schalter-Effizienz (oben) und Anteil von aktivem Gal4 im induzierten Zustand (unten) ist gleich gerichtet].

Ebenso intuitiv nachvollziehbar ist der Einfluss der Induktionsstärke von Gal80 auf die Schalter-Effizienz. Theoretisch würde eine hohe Schalter-Effizienz durch eine hohe Gal80-Konzentration im nicht-induzierten Zustand (zur Verstärkung der Gal4-Gal80-Interaktion) und eine niedrige Gal80-Konzentration im induzierten Zustand (zur effizienten Aufhebung der Inhibierung von Gal4) erreicht werden. Tatsächlich ist das Konzentrationsverhältnis jedoch umgekehrt (niedrige Gal80-Konzentration im nicht-induzierten und hohe Gal80-Konzentration im induzierten Zustand) und eine weitere Verstärkung dieses ungünstigen Verhältnisses durch Erhöhung der Induktionsstärke von Gal80 führt zu einer weiteren Verringerung der Schalter-Effizienz.



**Abbildung 19.** Einfluss der Variation der Parameter auf die Simulationsergebnisse mit dem naiven Modell. Die variierten Parameter sind unter der Abbildung angegeben, die entsprechenden Mittelwerte (m) sind in Tab. 3 aufgeführt. Alle Parameter wurden jeweils um -30% (m-30%) und +30% (m+30%) um den Mittelwert variiert. Die Simulationen wurden mit sämtlichen sich so ergebenden  $3^7$  Parameterkombinationen durchgeführt. Die Simulationsergebnisse (graue Pluszeichen) für Schalter-Effizienz (oben) und den Anteil an aktivem Gal4 im induzierten Zustand (unten) sind gruppiert nach Parametern (Obergruppen; zur Bezugnahme sind diese Spalten über dem Diagramm durchnummeriert worden) und Parameterwerten (Untergruppen) dargestellt. Zu jedem Parameter sind die Ergebnisse sämtlicher durchgeführter  $3^7$  Simulationen abgebildet (jedoch gruppiert nach den Werten des Parameters). Zu jeder Untergruppe sind Mittelwert (Quadrat) und Standardabweichung (vertikale Balken) der Simulationsergebnisse gezeigt. Die Veränderungen der Induktionsstärken von Gal4 und Gal80 haben keinen Einfluss auf den Anteil des aktiven Gal4 im induzierten Zustand. Dies beruht auf der Vorgehensweise bei der Simulation (siehe Text), welche dazu führt, dass diese Parameter keinen Einfluss auf die Konzentrationen der Regulatoren im induzierten Zustand haben. Vielmehr werden mit ihrer Hilfe die Konzentrationen im nicht induzierten Zustand berechnet und durch die Beeinflussung dieses Zustandes haben die Parameter einen Effekt auf die Schalter-Effizienz. Gal4<sub>0</sub>, Gal1<sub>0</sub> und Gal80<sub>0</sub> bezeichnen die Gesamtkonzentrationen von Gal4, Gal1 und Gal80.

Abbildung 19 zeigt zwei Diagramme, die den Einfluss der Variation von sieben Parametern auf die Schalter-Effizienz (oben) und den Anteil des aktiven Gal4 im induzierten Zustand (unten) zeigen. Die x-Achse ist in sieben Spalten (1-7) unterteilt, die jeweils drei Untergruppen (m-30%, m, m+30%) darstellen. Die Parameter sind: 1.  $K_0$  (Gal1-Gal80), 2.  $K_0$  (Gal4-Gal80), 3. Induktionsstärke von Gal80, 4. Induktionsstärke von Gal4, 5. Gal4<sub>0</sub>, 6. Gal1<sub>0</sub>, 7. Gal80<sub>0</sub>. In beiden Diagrammen sind Mittelwerte als Quadrate und Standardabweichungen als vertikale Balken dargestellt. Graue Pluszeichen zeigen Simulationsergebnisse für alle Parameterkombinationen.

An den hier vorgestellten Simulationen wird noch einmal die eingangs geäußerte Problemstellung deutlich, inwiefern der Schalter trotz relativ niedriger Affinität zwischen Gal1 und Gal80 und der starken Induktion von Gal80 effizient operieren kann. In diesem Abschnitt sollte verdeutlicht werden, dass ein Schalter auf der Basis des naiven Modells und unter Verwendung der experimentell ermittelten Parameter sehr ineffizient operiert. Auch die durch Variation der Parameter (um 30%) erreichbaren Schalter-Effizienzen bleiben weit unter den eingangs für einen „guten“ Schalter geforderten Werten.

#### 3.7.4. Modell Nummer 2: Ein komplexeres Interaktionsmodell

Im vorangegangenen Abschnitt ist die Problematik der mathematischen Modellierung des Galaktose-Schalters deutlich geworden. Auf der einen Seite stehen die experimentellen Daten (z.B. die Konzentrationen der Regulatoren oder die ermittelte relativ schwache Affinität zwischen  $K/Gal1$  und  $K/Gal80$ ). Auf der anderen Seite kann der Schalter auf der Basis des naiven Interaktionsmodells unter Verwendung dieser experimentellen Daten nur sehr ineffizient operieren.

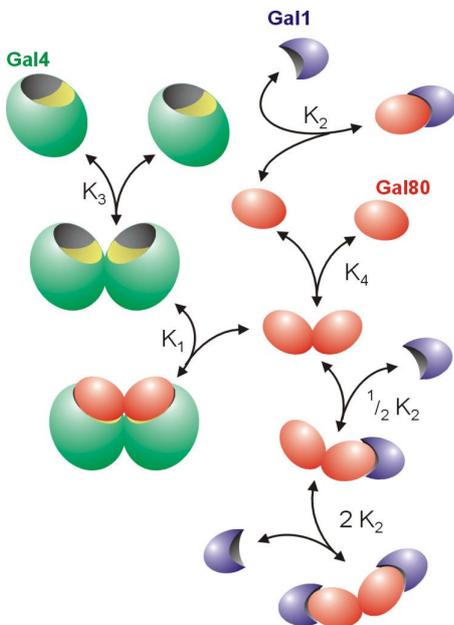
Interessanterweise müssen zum Erreichen einer hohen Schalter-Effizienz keine grundsätzlich veränderten Annahmen getroffen, sondern lediglich einige weitere (unter anderem in dieser Arbeit vorgestellte) Erkenntnisse zur Interaktion der Regulatoren in das Modell integriert werden.

Zum einen ist dies die Tatsache, dass  $K/Gal80$  dimerisieren kann (s. Abschnitt 3.3.1). Ebenso ist  $K/Gal4$  zur Dimerisierung befähigt (Pan *et al.*, 1990). In dem komplexeren Modell wird nun die Annahme getroffen, dass Gal4 und Gal80 ausschließlich als Dimere miteinander interagieren. Die Interaktionen der Monomere miteinander bzw. mit dem jeweils anderen Dimer wurden vollständig vernachlässigt, womit implizit eine kooperative Bindung zwischen Gal4-Dimer und Gal80-Dimer modelliert wurde. Diese Annahme beruht darauf, dass (i) die Proteine aus *K. lactis* dimerisieren können, wobei die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.4 eine kooperative Bindung der Dimere nahe legen und (ii) die Bindung zwischen ScGal4 und ScGal80 als Dimer-Dimer-Interaktion beschrieben wurde (Melcher und Xu, 2001).

Als  $K_D$ -Wert für die  $(Gal4)_2$ - $(Gal80)_2$ -Interaktion wurde wiederum der in den Inhibierungsexperimenten (mit miniScGal4) ermittelte Wert übernommen. Unter der Annahme, dass Gal4 und Gal80 in diesen Experimenten vollständig in dimerer Form vorlagen, ergibt sich ein mittlerer  $K_D$ -Wert von 0,5 nM ( $= \frac{1}{2} \cdot 1$  nM, da die effektive Konzentration der interagierenden Spezies durch die Dimerisierung halbiert wird).

Die Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 wurde derart formuliert, wie sie die in Abschnitt 3.3.3 vorgestellten Ergebnisse nahe legen: Die Bindung beider Proteine kann zur Bildung eines tetrameren Komplexes, bestehend aus einem  $K$ /Gal80-Dimer und zwei  $K$ /Gal1-Monomeren, führen. Da keine Multimerisierung von  $K$ /Gal1 nachgewiesen werden konnte, wurde für das Modell angenommen, dass die Bindung von Gal1 an Gal80 nicht-kooperativ erfolgt. Demzufolge wurde auch die Bindung zwischen Gal1-Monomer und Gal80-Monomer bzw. -Dimer formuliert. In Abb. 20 ist das Modell schematisch und in Form der entsprechenden Gleichungen dargestellt. Als Output der Simulationen diente wiederum die Menge an freiem Gal4 (diesmal Gal4-Monomer + Gal4-Dimer).

### A Schematische Darstellung



### B Gleichungen

$$G4_2 = G4 \cdot G4 / K_3$$

$$G80_2 = G80 \cdot G80 / K_4$$

$$G4_2G80_2 = G4_2 \cdot G80_2 / K_1$$

$$G1G80 = G1 \cdot G80 / K_2$$

$$G1G80_2 = G80_2 \cdot G1 / (K_2/2)$$

$$G1_2G80_2 = G1G80_2 \cdot G1 / (K_2 \cdot 2)$$

#### Massebilanzen:

$$G4_0 = G4 + 2 \cdot G4_2 + 2 \cdot G4_2G80_2$$

$$G80_0 = G80 + G1G80 + 2 \cdot G80_2 + 2 \cdot G1G80_2 + 2 \cdot G1_2G80_2 + 2 \cdot G4_2G80_2$$

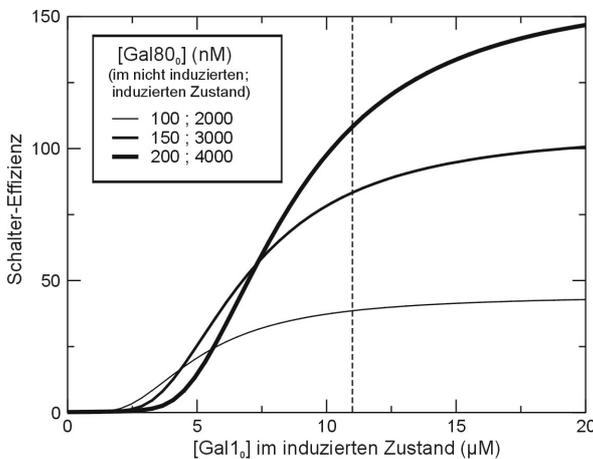
$$G1_0 = G1 + G1G80 + G1G80_2 + 2 \cdot G1_2G80_2$$

**Abbildung 20.** Das komplexere mathematische Modell. (A) Schematische Darstellung des Modells. Abgebildet sind die in dem Modell formulierten Spezies und deren Interaktionen mit den entsprechend verwendeten Gleichgewichtskonstanten. Die Proteine Gal4 und Gal80 dimerisieren jeweils (mit Dissoziationskonstanten  $K_3$  bzw.  $K_4$ ) und interagieren nur als Dimere miteinander ( $K_D = K_1$ ). Die Bindung von Gal1 an Gal80 ist unabhängig von dessen Dimerisierungszustand; sämtliche Interaktionen dieser beiden Proteine werden somit durch den gleichen  $K_D$ -Wert ( $K_2$ ) beschrieben. Die eventuell vor diesem  $K_D$ -Wert auftauchenden Faktoren stellen statistische Faktoren dar. Sie sind notwendig, da die zwei möglichen Bindungen von Gal1 an die zwei Bindestellen auf dem Gal80-Dimer (Gal80<sub>2</sub>) nicht explizit formuliert worden sind. Sie berücksichtigen, dass bei Bindung von Gal1 an Gal80<sub>2</sub> bzw. an Gal80<sub>2</sub>-Gal1 zwei Möglichkeiten zur Assoziation (unabhängig an jede Bindestelle des Gal80-Dimers) bzw. Dissoziation (beide Moleküle können unabhängig vom Gal80-Dimer dissoziieren) bestehen. (B) Gleichungen des mathematischen Modells. Die Bezeichnungen der Parameter (Gleichgewichtskonstanten) entsprechen den unter (A) verwendeten.  $G4_0$ ,  $G80_0$  und  $G1_0$  bezeichnen die Gesamtkonzentrationen von Gal4, Gal80 und Gal1.

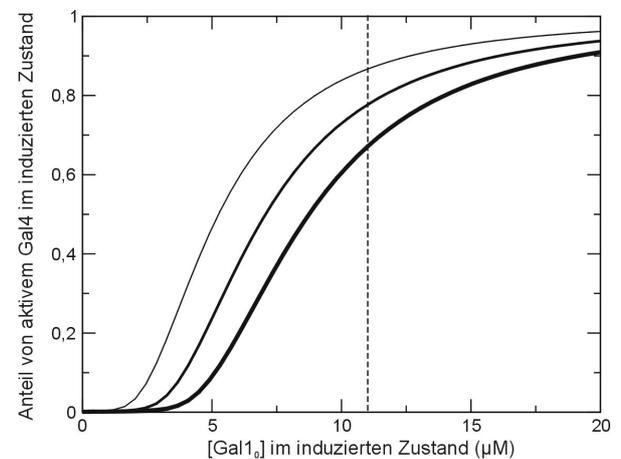
Die Simulationen mit diesem komplexeren Interaktionsmodell wurden analog zu den im vorigen Abschnitt gezeigten Simulationen durchgeführt. Die entsprechenden Konzentrationen der Regulatoren und Parameterwerte (soweit vorhanden) wurden übernommen. Für die Dimerisierung von Gal80 wurde ein  $K_D$ -Wert von 0,1 nM angenommen, was der Dimerisierungsstärke von ScGal80 entspricht (Melcher und Xu, 2001). Der  $K_D$ -Wert für die Gal4-Dimerisierung wurde willkürlich auf 1 nM gesetzt.

Die aus diesen Simulationen mit dem komplexeren Modell resultierenden Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Anhand der Abbildung wird deutlich, dass auf der Basis dieses Modells eine wesentlich höhere Schalter-Effizienz erreicht werden kann. Bei einer Gal1-Konzentration von 11  $\mu\text{M}$  bewegt sich diese, abhängig von der Gal80-Konzentration, in einem Bereich zwischen 40 und 110. Die Effizienz kann gesteigert werden durch Annahme einer stärkeren Dimerisierung von Gal4 und Gal80, was zu einer stärkeren Bindung beider Proteine im nicht-induzierten Zustand führt (Simulationen nicht gezeigt). Unter induzierenden Bedingungen kann ein hoher Anteil des gesamten Gal4-Proteins vom inhibitorischen Einfluss des Gal80-Proteins befreit werden (zwischen 65 und 85% bei 11  $\mu\text{M}$  Gal1; s. Abb. 21).

Schalter-Effizienz



Anteil von aktivem Gal4



**Abbildung 21.** Simulationen mit dem komplexeren Modell. Die Simulationen wurden analog zu den in Abb. 18 gezeigten durchgeführt. Die Interaktionsparameter, sofern im einfachen (naiven) Modell vorhanden, wurden ebenfalls übernommen. Dieses Modell enthält im Vergleich zum einfachen Modell zwei neue Parameter, welche die Dimerisierungen von Gal4 und Gal80 beschreiben. In den hier dargestellten Simulationen wurde für die Gal80-Dimerisierung ein  $K_D$ -Wert von 0,1 nM angenommen, was der Dimerisierungsstärke von ScGal80 entspricht (Melcher und Xu, 2001). Der  $K_D$ -Wert für die Gal4-Dimerisierung wurde willkürlich auf 1 nM gesetzt. Bei der durch Enzymmessungen abgeschätzten Gal1<sub>0</sub>-Konzentration von 11  $\mu\text{M}$  (gestrichelte Linie), ergibt sich unter den gewählten Bedingungen, abhängig von der Gal80<sub>0</sub>-Konzentration, eine Schalter-Effizienz zwischen ca. 40 und 110. Der Anteil von aktivem Gal4 im induzierten Zustand liegt hierbei zwischen 65 und 85%.

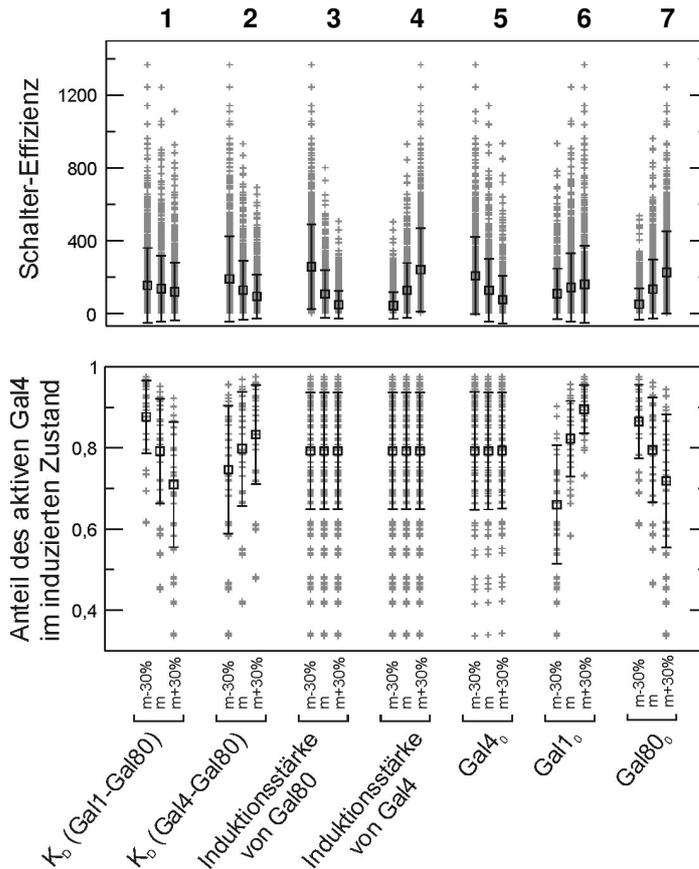
Auf der Basis des hier vorgestellten Modells kann also Gal1 trotz der relativ schwachen Interaktion mit Gal80 effektiv gegen die starke Gal4-Gal80-Interaktion kompetieren. Der Grund dafür liegt in der Art und Weise der Interaktionen der Regulatoren. Gal4 und Gal80 interagieren in diesem Modell ausschließlich als Dimere, wohingegen Gal1 auch als Monomer an das Gal80-Dimer binden kann. Dies bedingt letztlich, dass jeweils zwei relativ schwache Interaktionen (Gal1-Monomere an Gal80-Dimer) gegen eine sehr starke Interaktion (Gal80-Dimer mit Gal4-Dimer) kompetieren können. Auf diese Weise kann eine relativ schwache apparente Affinität effektiv einer sehr starken apparenten Affinität entgegenwirken. Eine grundsätzliche Annahme, welche in dieses Modell eingebracht wurde, ist also jene, dass die in den Inhibierungsexperimenten gemessene starke Affinität zwischen *K/Gal80* und *miniScGal4* auf einer kooperativen Bindung zwischen den beiden Dimeren beruht. Unter dieser Annahme lassen sich sowohl die Ergebnisse der Inhibierungsexperimente darstellen (Simulationen nicht gezeigt) als auch ein effektiver Schaltmechanismus konstruieren.

Auch mit diesem Modell wurde wiederum eine Variation der Parameter durchgeführt. Die Vorgehensweise entspricht der im letzten Abschnitt beschriebenen. In Abbildung 22 sind die entsprechenden Simulationsergebnisse dargestellt. In der Abbildung wird deutlich, dass durch Variation der Parameterwerte mit diesem Modell eine Schalter-Effizienz von bis zu 1200 erreicht werden kann. Das heißt, ein Schalter auf der Basis dieses Modells kann prinzipiell den eingangs erwähnten Anforderungen an einen effektiven Schalter genügen.

Für das Erreichen einer hohen Schalter-Effizienz gewinnen in diesem Modell, im Unterschied zum naiven Modell, jene Parameter an Bedeutung, welche eine stärkere Repression von Gal4 im nicht-induzierten Zustand ermöglichen. Diese stärkere Inhibierung von Gal4 kann erreicht werden durch eine Erhöhung der Affinität zwischen Gal4 und Gal80 und eine Erhöhung der Konzentration von Gal80 (s. dazu Abbildung 22 zweite und hintere Spalte im Vergleich zu diesen Spalten in Abb. 19). Diese Tatsache ist erneut Ausdruck dessen, dass in dem hier verwendeten Modell Gal1 sehr effektiv gegen die Bindung zwischen Gal4 und Gal80 kompetieren kann. Eine Erhöhung der Schalter-Effizienz kann hier somit primär durch eine Verringerung des Anteils an aktivem Gal4 im nicht-induzierten Zustand erreicht werden (und nicht mehr primär durch eine Erhöhung des Anteils im induzierten Zustand).

Neben der Fähigkeit zum Erreichen einer hohen Schalter-Effizienz besitzt das in diesem Abschnitt vorgestellte komplexere Interaktionsmodell weitere interessante Eigenschaften. Eine dieser Eigenschaften ist die in Abbildung 21 erkennbare Fähigkeit zur Ausbildung eines ausgeprägten Schaltverhaltens (sigmoider Kurvenverlauf). Das wiederum hat zur Folge, dass das Modell sehr sensitiv in Bezug auf die Quantität der Parameter und die Konzentrationen der Regulatoren reagieren kann. In bestimmten Konzentrationsbereichen können leichte

Veränderungen der Konzentrationen oder Interaktionsparameter zu starken Effekten führen. Auf der Basis dieses Modells könnten somit möglicherweise die Befunde erklärt werden, dass eine moderate Überexpression von *KIGAL80* bzw. (wahrscheinlich) eine leichte Verringerung der Affinität zwischen *KIGal80* und *KIGal1* zum vollständigen Ausfall der Galaktose-Induktion führen (s. Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2).



**Abbildung 22.** Einfluss der Variation der Parameter auf die Simulationsergebnisse mit dem komplexeren Modell. Die Simulationen und die Darstellung der Ergebnisse erfolgten analog zu den in Abbildung 19 dargestellten Simulationen. Die Mittelwerte (m) der Parameter sind wiederum aus Tabelle 3 entnommen worden, mit der Ausnahme, dass für die Interaktion zwischen (Gal4)<sub>2</sub> und (Gal80)<sub>2</sub> ein mittlerer Wert von 0,5 nM (statt 1 nM) vorgegeben wurde, da die effektive Konzentration der interagierenden Spezies in diesem Modell im Vergleich zum naiven Modell halbiert ist (s. dazu auch Text). Die  $K_D$ -Werte für die Dimerisierungen von Gal4 und Gal80 wurden nicht variiert und entsprechen den unter Abbildung 21 angegebenen Werten (1 bzw. 0,1 nM).

### 3.7.5. Kopplung der Regulatoren Gal1 und Gal80

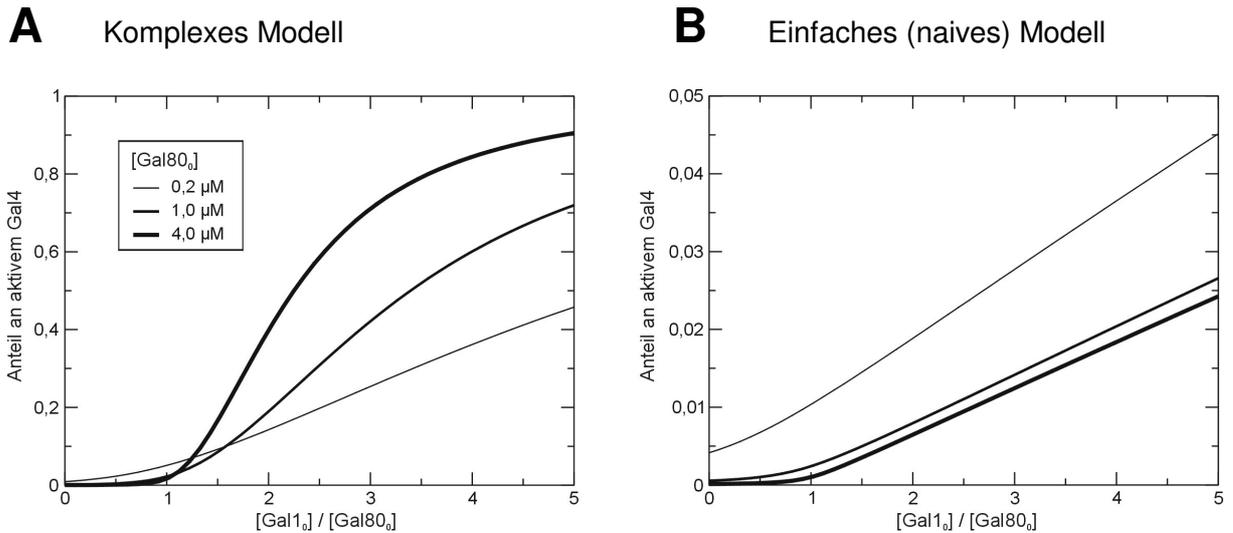
*KIGal80* wird, ebenso wie *KIGal1*, im Zuge der Galaktose-Induktion stark induziert (Zenke *et al.*, 1993). Dies bedeutet, dass die Expression beider Proteine an den gleichen Schalter (nämlich den Galaktose-Schalter) gebunden ist. In erster Annäherung kann somit angenommen werden, dass das Verhältnis zwischen Gal1 und Gal80 in beiden betrachteten Zuständen (nicht-induzierter und induzierter Zustand) konstant ist, dass also beide Proteine um den

gleichen Faktor induziert werden. Die beiden Regulatoren (bzw. deren Induktionsstärken) sind somit aneinander gekoppelt.

Eine Kopplung von Gal80 an den Schalter und damit verbunden eine Kopplung der beiden Regulatoren Gal1 und Gal80 aneinander bewirkt prinzipiell eine Verschlechterung der Schalter-Effizienz, unabhängig von dem zu Grunde liegenden Modell. In den bislang vorgestellten Simulationen äußert sich dieser Umstand zum Beispiel dadurch, dass eine Verringerung der Induktionsstärke von Gal80 jeweils zu einer Erhöhung der Schalter-Effizienz führt (s. Abbildung 19 und 22). Die Tatsache, dass *KIGAL80* stark induziert wird (bzw. an den Schalter gekoppelt ist), wirkt also der Effizienz des Galaktose-Schalters entgegen. Dennoch besteht diese Kopplung *in vivo* (sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *K. lactis*), was offenbar aus einem anderen Grund notwendig ist (s. dazu Diskussion in Abschnitt 4.7). Diese, in Hinsicht auf das Erreichen einer hohen Schaltereffizienz, ungünstige Voraussetzung der Kopplung von Gal80 und Gal1 an den gleichen Schalter kann jedoch durch das komplexe Modell (im Gegensatz zu dem naiven Modell) teilweise kompensiert werden durch eine sehr bemerkenswerte Eigenschaft.

Diese Eigenschaft ist die inhärente Fähigkeit zur Stabilisierung des induzierten Zustandes durch „Bevorzugung“ der Gal1-Gal80-Interaktion bei hohen Konzentrationen dieser Proteine. Entsprechend kann der nicht-induzierte Zustand durch „Bevorzugung“ der Gal4-Gal80-Interaktion bei niedrigen Konzentrationen aller Regulatoren stabilisiert werden. In Abb. 23A sind entsprechende Simulationen zur Veranschaulichung dieses Sachverhaltes dargestellt (Abb. 23B zeigt die gleichen Simulationen für das naive Modell, welches die hier betrachtete Eigenschaft nicht besitzt). Gezeigt ist der Anteil an aktivem Gal4 in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis zwischen Gal1 und Gal80. Durchgeführt wurden diese Simulationen für verschiedene Konzentrationen von Gal80. Es ist zu erkennen, dass die Zunahme der Gal80-Konzentration bei gleich bleibendem Verhältnis zwischen Gal1 und Gal80 zu einer stärkeren Aktivierung von Gal4 führt, sobald ein bestimmtes Konzentrationsverhältnis zwischen beiden Proteinen überschritten wird. Alternativ ausgedrückt heißt dies, dass der Anstieg der Gal80-Konzentration zu einer zunehmenden Aktivierung von Gal4 führt, sofern dieser Anstieg an eine Zunahme von Gal1 in gleichem Maß gekoppelt ist.

Diese Simulationen bieten keine Erklärung dafür, aus welchem Grund Gal80 induziert wird bzw. an den gleichen Schalter gekoppelt ist wie Gal1 (s. dazu Abschnitt 4.7). Sie zeigen jedoch, dass bei einer solchen Kopplung eine Zunahme der Gal80-Konzentration (entspricht dann auch einer Zunahme der Gal1-Konzentration) im komplexeren Modell den Induktionsvorgang unterstützt und diesem nicht entgegenwirkt (wie im naiven Modell). Eine kurze Diskussion zu diesem Phänomen findet sich in Abschnitt 4.4.



**Abbildung 23.** Die Zunahme der Gal80-Konzentration führt im komplexen Modell bei gleich bleibendem Verhältnis zwischen Gal1 und Gal80 zu einer stärkeren Aktivierung von Gal4. (A) Simulationen mit dem komplexen Modell. Dargestellt ist der Anteil von aktivem Gal4 in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses zwischen Gal1 und Gal80. Die Simulationen wurden mit jeweils gleicher Konzentration von Gal4<sub>0</sub> (80 nM) und für drei verschiedene Gal80<sub>0</sub>-Konzentrationen (s. Legende) durchgeführt. Die Parameterwerte des Modells entsprechen denen der vorher gezeigten Simulationen. Bleibt das Verhältnis von Gal1<sub>0</sub> zu Gal80<sub>0</sub> gleich (in den hier gezeigten Simulationen ab einem Verhältnis von ca. 2), so führt eine Erhöhung der Gal80<sub>0</sub>-Konzentration zu einer stärkeren Aktivierung von Gal4. (B) Zum Vergleich sind die gleichen Simulationen mit dem naiven Modell (s. Abschnitt 3.7.3) abgebildet. In diesem Modell führt die Erhöhung der Gal80<sub>0</sub>-Konzentration bei gleich bleibendem Verhältnis zwischen Gal1<sub>0</sub> und Gal80<sub>0</sub> zu einer verminderten Aktivität von Gal4.

### 3.7.6. Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 im nicht-induzierten Zustand

Die im vorigen Abschnitt dargelegte Eigenschaft des komplexeren Modells ist (unter anderem) der Grund dafür, dass ein Schalter auf dessen Basis auch dann noch relativ effizient operieren kann, wenn in den Simulationen die Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 im nicht-induzierten Zustand berücksichtigt wird. Diese Interaktion ist in den bislang vorgestellten Simulationen völlig vernachlässigt worden. Es gibt jedoch eine Reihe von Befunden, welche nahe legen, dass eine Interaktion zwischen *KIGal1* und *KIGal80* auch in Abwesenheit von Galaktose (im Wachstumsmedium) stattfindet und damit die Aktivität des *GAL*-Regulons beeinflussen kann. So führt zum Beispiel die Überexpression von *KIGal80* zu einer nukleären Akkumulation von *KIGal1* auch unter nicht-induzierenden Bedingungen (s. Abschnitt 3.5), was ein Indiz für die Interaktion beider Proteine in Abwesenheit von Galaktose im Medium ist. Die Tatsache, dass die konstitutive Überexpression von *KIGAL1* zu einer „partiellen“ Induktion des *GAL*-Regulons bei Wachstum in nicht induzierendem Medium führt (s. z.B. Zachariae, 1994 und diese Arbeit Abschnitt 3.4.1), zeigt zudem, dass diese Interaktion einen Einfluss auf die Aktivität des *GAL*-Regulons hat.

Die Ursache für die Bindung unter nicht induzierenden Bedingungen könnte z. B. auf der inhärenten Fähigkeit beider Proteine zur Galaktose-unabhängigen Interaktion oder auf einer konstitutiven intrazellulären Produktion des induzierenden Zuckers Galaktose (Cardinali *et al.*, 1997) beruhen. An dieser Stelle soll lediglich festgehalten werden, dass eine Gal1-Gal80-Interaktion unter nicht induzierenden Bedingungen stattfinden kann. Die Anwesenheit von Galaktose im Medium bewirkt somit lediglich eine Steigerung der Affinität um einen bestimmten Faktor und nicht einen grundsätzlichen binären (qualitativen) Unterschied zwischen den beiden Zuständen, wie er in den bisherigen Simulationen durch Vernachlässigung der Gal1-Gal80-Interaktion im nicht-induzierten Zustand angenommen worden war.

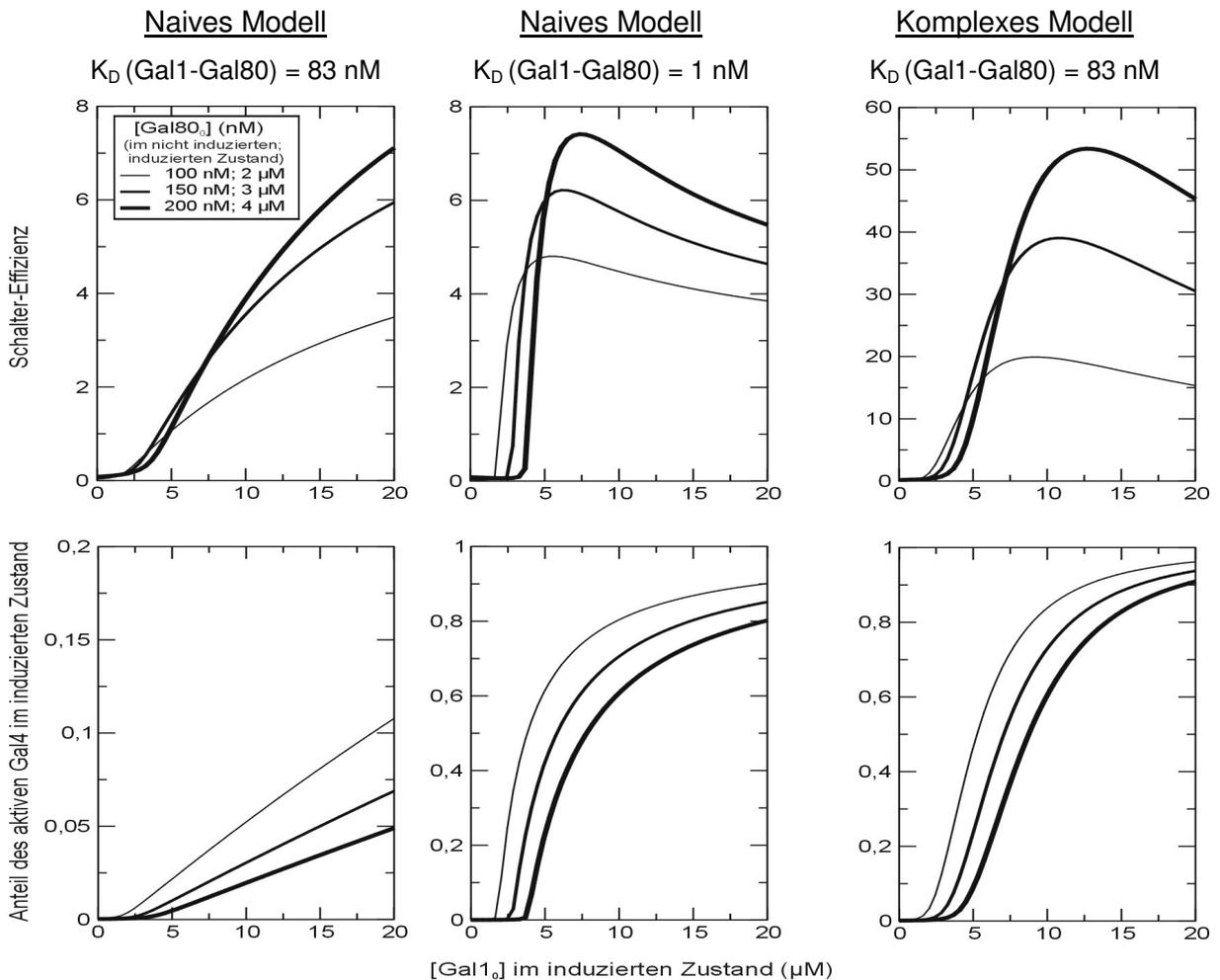
Ausgehend von dieser Sichtweise wird in den folgenden Simulationen angenommen, dass die beiden Affinitäten (mit und ohne Galaktose) zwischen Gal1 und Gal80 aneinander gekoppelt sind, sich also lediglich um einen bestimmten Faktor unterscheiden.

Damit einher geht eine Kopplung der Regulatoren selbst aneinander (s. dazu voriger Abschnitt), womit der Tatsache entsprochen werden soll, dass die Induktion von Gal1 und Gal80 an den gleichen Schaltmechanismus gebunden ist. Hier wird angenommen, dass das Verhältnis zwischen Gal1 und Gal80 in beiden betrachteten Zuständen (nicht-induzierter und induzierter Zustand) konstant bleibt, dass also beide Proteine um den gleichen Faktor induziert werden.

Unter diesen Annahmen besteht nun die Problematik darin, das Eingangssignal einer (möglicherweise relativ schwachen) Affinitätsveränderung zwischen Gal1 und Gal80, verbunden mit einer Konzentrationsveränderung beider Proteine (ohne Veränderung des Verhältnisses zwischen beiden Konzentrationen), in ein möglichst starkes Ausgangssignal zu verwandeln, also eine möglichst hohe Schalter-Effizienz zu erreichen.

Die Simulationen, welche mit den veränderten Annahmen (Kopplungen der Regulatoren und Affinitäten) durchgeführt wurden, sind in Abb. 24 dargestellt. Die Abbildung zeigt wiederum Schalter-Effizienz und Anteil des aktiven Gal4 (im induzierten Zustand) in Abhängigkeit von der Gal1-Konzentration im induzierten Zustand. Für die Induktionsstärke von Gal1 wurde ein Faktor von 20 angenommen. Dies entspricht der Induktionsstärke von Gal80 und bedeutet somit eine Kopplung dieser beiden Proteine. Für die Konzentration von Gal1 im nicht-induzierten Zustand ergibt sich damit jeweils ein Zwanzigstel der Konzentration im induzierten Zustand. Für die Affinität zwischen Gal1 und Gal80 im nicht-induzierten Zustand wurde willkürlich angenommen, dass sie um einen Faktor 10 geringer ist als im induzierten Zustand. In Abb. 24 ist zu erkennen, dass unter diesen Annahmen ein auf dem naiven Interaktionsmodell basierender Schalter sowohl bei niedriger (links) als auch bei hoher (Mitte) Affinität zwischen Gal1 und Gal80 nur sehr geringe Schalter-Effizienzen erreichen kann. Ein auf dem komplexeren Interaktionsmodell beruhender Schalter hingegen kann auch bei einer Kopplung der Regulatoren und Affinitäten noch relativ effizient operieren (s. Abb. 24, rechts).

Ein Grund dafür ist die oben dargelegte Fähigkeit des komplexeren Modells zur Stabilisierung des induzierten Zustandes allein durch Erhöhung der Konzentrationen von Gal1 und Gal80, ohne deren Verhältnis zueinander zu verändern. Unter den gewählten Annahmen zeigen die Simulationen mit diesem Modell ein Optimum der Konzentration von Gal1 zum Erreichen einer hohen Schaltereffizienz. Abhängig von der vorgegebenen Gal80-Konzentration liegt dieses im induzierten Zustand zwischen ca. 9 u 12  $\mu\text{M}$  (dies entspricht in etwa der in Abschnitt 3.6 abgeschätzten Konzentration von ca. 11  $\mu\text{M}$ ).



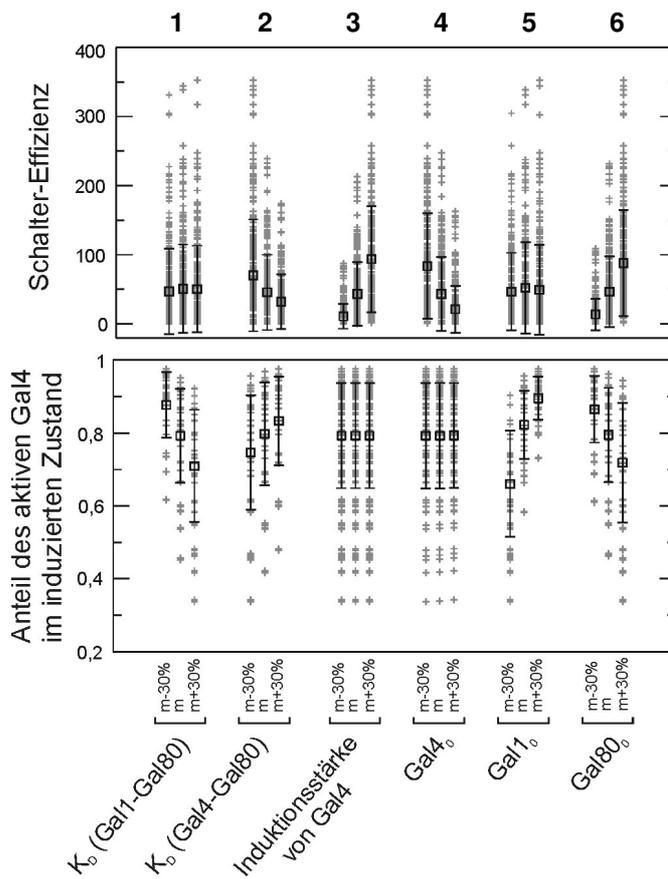
**Abbildung 24.** Simulationen mit naivem und komplexerem Modell bei Kopplung der Regulatoren Gal1 und Gal80. Die Simulationen wurden ähnlich zu den in den Abbildungen 18 und 21 gezeigten Simulationen durchgeführt, alle Parameterwerte wurden entsprechend übernommen. Allerdings wurde in den hier gezeigten Simulationen die Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 im nicht induzierten Zustand berücksichtigt. Die Konzentration von Gal1 im nicht-induzierten Zustand wurde jeweils anhand von dessen Konzentration im induzierten Zustand berechnet. Hierfür wurde ein Faktor von 20 für die Induktion dieses Proteins angenommen. Dies entspricht der für Gal80 verwendeten Induktionsstärke und bedeutet somit eine Kopplung der Konzentrationen beider Regulatoren aneinander. Die Simulationen mit dem naivem Modell erfolgten unter Annahme der experimentell bestimmten (83 nM; links) und einer sehr viel höheren (1nM; Mitte) Affinität zwischen Gal1 und Gal80 für den induzierten Zustand. In den Simulationen mit dem komplexeren Modell (rechts) wurde für die Affinität zwischen Gal1 und Gal80 im induzierten Zustand der experimentell bestimmte Wert (83 nM) vorgegeben. Für die Interaktion beider Proteine im nicht-induzierten Zustand wurde jeweils angenommen, dass sie 10-fach schwächer ist als im induzierten Zustand.

In den Simulationen, welche in den vorangegangenen Abschnitten 3.7.3 und 3.7.4 vorgestellt wurden, waren die Kopplungen nicht berücksichtigt worden. Dies hatte dazu geführt, dass Veränderungen (i) der Affinität zwischen Gal1 und Gal80 im induzierten Zustand und (ii) der Gal1-Konzentration im induzierten Zustand jeweils monoton korrelierten mit einer Veränderung der Schalter-Effizienz. Führt man die Kopplungen ein, nimmt man also an, dass (i) eine Erhöhung der apparenten Affinität zwischen Gal1 und Gal80 im induzierten Zustand mit einer Erhöhung der apparenten Affinität im nicht-induzierten Zustand und (ii) eine Erhöhung der Gal1-Konzentration im induzierten Zustand mit einer Erhöhung der Gal1-Konzentration im nicht-induzierten Zustand verbunden ist, dann ist die Wirkung von Veränderungen dieser Parameter auf die Schalter-Effizienz nicht mehr monoton. Die Schalter-Effizienz kann also nicht mehr beliebig gesteigert werden durch eine Erhöhung der Affinität zwischen Gal1 und Gal80 (vgl. dazu in Abb. 24 die Simulationen mit dem naiven Modell für zwei verschiedene Gal1-Gal80-Affinitäten) oder durch eine Erhöhung der Gal1-Konzentration im induzierten Zustand (s. Abb. 24). In Hinsicht auf das Erreichen einer möglichst hohen Schalter-Effizienz besitzen diese Parameter nun optimale Werte (welche von den Werten der anderen Parameter abhängen).

Um einen Eindruck davon zu gewinnen, welche Schalter-Effizienzen auf der Basis des komplexeren Modells unter der Vorgabe der Kopplungen erreicht werden können, wurden unter diesen Annahmen wiederum Simulationen mit Variationen der Parameterwerte (um +30% und -30%) durchgeführt. Das Vorgehen bei den Simulationen entsprach dabei prinzipiell dem vorher beschriebenen, mit der Ausnahme, dass in diesen Simulationen die Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 im nicht-induzierten Zustand berücksichtigt wurde. Die Induktionsstärke von Gal1 wurde der von Gal80 gleich gesetzt (auf einen Wert von 20), beide Induktionsstärken wurden nicht variiert. Somit war in den einzelnen Simulationen das Verhältnis von Gal1 zu Gal80 im nicht-induzierten und induzierten Zustand gleich (Kopplung der Regulatoren). Die Affinität zwischen beiden Proteine im nicht-induzierten Zustand wurde wiederum anhand ihrer Affinität im induzierten Zustand ermittelt (Kopplung der Affinitäten). Hierbei wurde erneut willkürlich eine 10-fach geringere Affinität für den nicht-induzierten Zustand angenommen. Die Simulationsergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

In der Abbildung wird erkennbar, dass auf der Basis des komplexeren Interaktionsmodells unter den oben aufgeführten Annahmen durch eine Variation der Parameter (um 30%) noch Schalter-Effizienzen von ca. 350 erreicht werden können. Die Veränderungen der Gal1-Konzentration und der Affinität zwischen Gal1 und Gal80 haben nur einen sehr geringen Einfluss auf die Effizienz des Schalters. In Hinsicht auf das Erreichen einer möglichst hohen Schalter-Effizienz scheinen die experimentell bestimmten Werte dieser Parameter unter den gegebenen Annahmen in einem optimalen Bereich zu liegen (die Mittelwerte der Simulati-

onsergebnisse erreichen jeweils bei den experimentell bestimmten Werten dieser Parameter den höchsten Stand). Hier deutet sich an, dass die zunächst nachteilig erscheinende niedrige Affinität zwischen Gal1 und Gal80 bei Berücksichtigung der Kopplungen optimal für das Erreichen einer möglichst hohen Schalter-Effizienz ist.



**Abbildung 25.** Variation der Parameter im komplexen Modell bei Kopplung von Gal1 und Gal80. Die Simulationen und die Darstellung der Ergebnisse erfolgten wie in Abb. 22 beschrieben. Im Unterschied zu den dort gezeigten Simulationen war hier das Konzentrationsverhältnis zwischen Gal1 und Gal80 bei der Simulation von nicht induziertem und induziertem Zustand jeweils gleich. In allen hier dargestellten Simulationen wurde die Induktionsstärke der beiden Proteine mit 20 vorgegeben. Dieser Parameter wurde nicht variiert und ist demzufolge nicht an der Abszisse aufgeführt. Der Parameter  $K_D$  (Gal1-Gal80) bezeichnet die Affinität zwischen Gal1 und Gal80 im induzierten Zustand, für die Interaktion beider Proteine im nicht induzierten Zustand wurde jeweils eine 10-fach schwächere Affinität angenommen.

Wie schon in Abbildung 22 deutlich wurde, ist zum Erreichen einer möglichst hohen Schalter-Effizienz auf der Basis des komplexeren Modells eine starke Repression von Gal4 im nicht-induzierten Zustand (durch Steigerung der Gal4-Gal80-Affinität oder durch Erhöhung der Gal80-Konzentration) notwendig. Zudem kann die Effizienz stark erhöht werden durch eine Verringerung der Konzentration von Gal4 und durch eine Erhöhung der Induktionsstärke von Gal4 (was wiederum auf der Definition der Schalter-Effizienz beruht).

Bei einem Vergleich der in diesem Abschnitt vorgestellten Simulationsergebnisse mit denen der vorangegangenen Abschnitte wird deutlich, dass eine starke Kopplung der Regulatoren Gal1 und Gal80 (verbunden mit der Annahme einer Interaktion im nicht-induzierten Zustand) prinzipiell eine Verringerung der Schalter-Effizienz zur Folge hat. In Hinsicht auf das Erreichen einer möglichst hohen Schalter-Effizienz stellt diese Kopplung also einen Nachteil dar.

Ein Schalter auf der Basis des komplexeren Interaktionsmodells kann jedoch auch unter dieser ungünstigen Voraussetzung noch relativ effizient operieren, was unter anderem auf der im vorigen Abschnitt vorgestellten Eigenschaft beruht, dass bei niedrigen Konzentrationen aller Regulatoren von Gal80 die Bindung an Gal4 „bevorzugt“ wird, bei hohen Konzentrationen von Gal1 und Gal80 (trotz gleich bleibendem Verhältnis zwischen diesen Proteinen) hingegen die mit relativ niedriger Affinität erfolgende Bindung an Gal1.

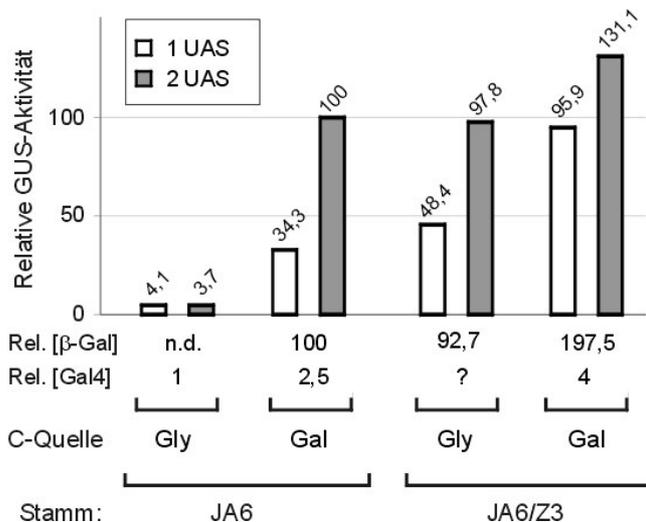
### 3.8. Beeinflussung der Galaktose-Induktion durch Promotorvariante und *K*Gal4-Menge

In den Simulationen, welche in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellt wurden, resultierte eine Steigerung der Induktionsstärke (der Schalter-Effizienz) lediglich aus der Erhöhung der Konzentration von freiem (nicht an Gal80 gebundenem) Gal4. Weitere Effekte, welche zu einer Steigerung der Schalter-Effizienz führen können, sind in dem Modell nicht berücksichtigt worden. Für *S. cerevisiae* ist zum Beispiel die synergistische Wirkung von multiplen Gal4-Bindestellen im Promotor auf die induzierte Aktivität des entsprechenden Gens (und damit auf die Schalter-Effizienz) gezeigt worden (siehe z.B. Carey *et al.*, 1990). Die Anwesenheit mehrerer Gal4-Bindestellen im Promotor eines *GAL*-Gens führt in *S. cerevisiae* nicht allein zu einer Erhöhung der induzierten Expression, sondern zudem zu einer Verminderung der Basalexpression (nicht-induzierte Expression; Melcher und Xu, 2001), was einen weiteren Mechanismus zur Erhöhung der Schalter-Effizienz darstellt. Die synergistische Wirkung multipler Gal4-Bindestellen bei der Aktivierung eines Gens könnte z.B. darauf beruhen, dass für eine effiziente Transkription multiple Kontakte zwischen Aktivator und Transkriptionsmaschinerie geknüpft werden müssen (Carey *et al.*, 1990). Ein anderer einfacher Mechanismus zur Erklärung des synergistischen Effektes könnte darin bestehen, dass der Aktivator selbst kooperativ an den Promotor bindet (Xu *et al.*, 1995).

In *K. lactis* besitzen sämtliche *GAL*-Gene einen Promotor mit mindestens zwei Gal4-Bindestellen (UAS), die einzige Ausnahme ist der *KIGAL4*-Promotor selbst, welcher lediglich eine Gal4-Bindestelle enthält. *KIGAL4* wird auch im induzierten Zustand, im Gegensatz zu den anderen *GAL*-Genen, nur sehr schwach exprimiert. Hier stellt sich wiederum die Frage, inwiefern diese sehr schwache Expression des Promotors mit nur einer UAS auf einem prinzipiellen Defizit beruht (weil z.B. mehrere Kontakte zur Transkriptionsmaschinerie geknüpft werden müssen) oder lediglich eine Folge der geringen lokalen Gal4-Konzentration am Promotor ist. Vereinfacht ausgedrückt, stellt sich hier z.B. die Frage, ob eine voll abgesättigte UAS zur gleichen Aktivität führt wie zwei zur Hälfte gesättigte UAS.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde als Reporterkonstrukt ein Centromer-Plasmid herangezogen, welches für eine Fusion aus *KIGAL80*-Promotor und *GUS*-Reporter gen codiert (pC80GUS; Zenke *et al.*, 1993). Der *KIGAL80*-Promotor aus *K. lactis* enthält zwei Bindestellen mit hoher Affinität zum Gal4-Protein (UAS I und UAS II; Zenke *et al.*, 1993). In diesem Konstrukt wurde die distale Gal4-Bindestelle (UAS II) partiell deletiert (die Deletion umfasst eine der für die Gal4-Bindung benötigten palindromischen Sequenzen; s. Abschnitt 2.4), wodurch das Plasmid pC80GUS-DUAS2 erhalten wurde.

Die Aktivitäten der beiden Promotor-Varianten wurden zunächst im Hintergrund des Wildtypstammes JA6 unter induzierenden (Galaktose) und nicht induzierenden (Glyzerin) Bedingungen durch Messung der GUS-Aktivität bestimmt. Wie in Abbildung 26 erkennbar, ist im Wildtyp Hintergrund unter induzierenden Bedingungen ein sehr leichter synergistischer Effekt der Anzahl der Gal4-Bindestellen im Promotor erkennbar. Die Deletion einer UAS im *KIGAL80*-Promotor führt zu einer Reduktion der Promotoraktivität um ca. 65% im induzierten Zustand. In *S. cerevisiae* ist auch die basale (nicht-induzierte) Expression der *GAL*-Gene abhängig von der Anzahl der UAS im Promotor. Das Vorhandensein von zwei oder mehr UAS im Promotor führt zu einer niedrigeren Basalexpression als die Anwesenheit von nur einer Gal4-Bindestelle (Melcher und Xu, 2001). In *K. lactis*, zumindest im Fall der hier untersuchten Promotoren, scheint die Anzahl der Bindestellen keinen signifikanten Einfluss auf die Basalexpression zu haben (s. Abb. 26 Messwerte zu JA6 in Glyzerin).



**Abbildung 26.** Abhängigkeit der Aktivität des *KIGAL80*-Promotors von der Anzahl der Gal4-Bindestellen und der Menge an *KGal4*. Zellen der Stämme JA6 und JA6/Z3 wurden mit den Plasmiden pC80GUS-DUAS2 (1 UAS; *KIGAL80*-Promotor-*GUS*-Fusion mit einer Gal4-Bindestelle im Promotor) bzw. pC80GUS (2 UAS; zwei Gal4-Bindestellen im Promotor) transformiert und auf SM-Glyzerin- (Gly) bzw. SM-Galaktose-Medium (Gal) unter selektiven Bedingungen (ohne Uracil und Tryptophan) über Nacht vorgezogen. Die Zellsuspensionen wurden jeweils durch Verdünnung (1:15) in frisches Medium gleicher Zusammensetzung überführt und für weitere sechs Stunden angezogen. Anschließend erfolgten Ernte und Proteinaufschluss für die Messung von GUS- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten (s. Abschnitt 2.14.1). Die GUS-Aktivitäten wurden auf

die Aktivität des in Galaktose-Medium gewachsenen Stammes JA6 mit Plasmid pC80GUS bezogen. Unter dem Diagramm sind die Mittelwerte der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den Proteinextrakten angegeben; die Werte wurden jeweils auf die Aktivität des in Galaktose-Medium gewachsenen Stammes JA6 bezogen. Die Angaben zur relativen *KGal4*-Menge wurden der Literatur entnommen (Zachariae und Breunig, 1993; Zachariae, 1994). n.d.: nicht bestimmt. ?: keine Angabe dazu gefunden.

Um weiter zu testen, ob der leichte synergistische Effekt unter induzierenden Bedingungen auf eine kooperative Bindung der *KIGal4*-Moleküle an den *KIGAL80*-Promotor zurückgeführt werden könnte, wurden die Aktivitäten der beiden Promotorvarianten bei leicht erhöhter Menge an intrazellulärem *KIGal4* gemessen. Als Stammhintergrund diente hierfür JA6/Z3. Dieser Stamm enthält zwei Kopien eines *KIGAL4*-Gens, welches eine Mutation der UAS im Promotor besitzt und infolgedessen kaum autoreguliert ist (Zachariae, 1994). Unter induzierenden Bedingungen besitzt dieser Stamm gegenüber dem Wildtypstamm eine ca. 1,5-fach erhöhte Menge an *KIGal4* (Zachariae, 1994). Durch die nur sehr leichte Überexpression von *KIGAL4* sollten zytotoxische Effekte vermieden werden, welche durch starke Überexpression von *KIGAL4* bedingt werden (Breunig, 1989).

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, führt die leichte Überexpression von *KIGAL4* zu einer Angleichung der Aktivitäten der beiden untersuchten Promotorvarianten im induzierten Zustand (Aktivität von pC80GUS-DUAS2 beträgt hier 73% der Aktivität von pC80GUS). Der synergistische Effekt der Anzahl der UAS im Promotor geht bei leichter Erhöhung der *KIGal4*-Menge also verloren. Diese Daten deuten darauf hin, dass der Promotor mit einer UAS prinzipiell zu einer ähnlich starken Aktivität wie der Promotor mit zwei UAS befähigt ist. Ähnliches wurde auch für *S. cerevisiae* gezeigt (Xu *et al.*, 1995). Somit liegt der Schluss nahe, dass die leichte synergistische Wirkung der zwei UAS im *KIGAL80*-Promotor primär auf der kooperativen Bindung der *KIGal4*-Moleküle beruht und nicht auf einer kooperativen Wirkung der gebundenen *KIGal4*-Moleküle selbst (z.B. durch synergistische Effekte bei der Rekrutierung des Transkriptionsapparates).

Überraschenderweise wurde in den hier gezeigten Experimenten festgestellt, dass eine Induktion des *GAL*-Regulons durch leichte Erhöhung der *KIGal4*-Menge auch unter nicht induzierenden Bedingungen erfolgen kann. Die Promotoraktivitäten der Reporterkonstrukte im Stamm JA6/Z3 gleichen unter nicht-induzierenden Bedingungen denen im Stamm JA6 unter induzierenden Bedingungen. Auch die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in den entsprechenden Extrakten zeigen keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 26). Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass in den beiden betrachteten Fällen der Zustand des *GAL*-Regulons insgesamt (und demzufolge die Konzentrationen aller *GAL*-Proteine mit Ausnahme von *KIGal4*) vergleichbar ist. Die hier beobachtete Induktion lässt sich mit einem Austitrieren von *KIGal80* durch *KIGal4* nicht erklären: Der Stamm JA6/Z3 besitzt im induzierten Zustand gegenüber dem nicht-induzierten Wildtypstamm eine lediglich ca. 3-4 fach höhere Konzentration an *KIGal4* (Zachariae, 1994; s. auch Abb. 26), die Konzentration von *KIGal80* hingegen steigt während der Induktion in einem wesentlich stärkeren Ausmaß (Faktor 20 nach den hier gezeigten Messungen). Betrachtet man also lediglich das Verhältnis von *KIGal4* zu *KIGal80*, so ist dieses im Stamm JA6/Z3 unter nicht induzierenden Bedingungen (welche zur Induktion

führen) wesentlich geringer als im Wildtypstamm unter nicht induzierenden Bedingungen (welche nicht zur Induktion führen).

Zum Teil könnte dieses Phänomen evtl. auf der Basis der in Abschnitt 3.7.5 gezeigten Simulationen erklärt werden. Wird einmal eine hohe Konzentration der Regulatoren *KGal1* und *KGal80* erreicht, dann wird die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen „bevorzugt“ und demzufolge eine höhere Aktivität von *KGal4* erreicht (Stabilisierung des induzierten Zustandes). In Kombination mit einer Erhöhung der *KGal4*-Menge und damit einhergehend einer höheren lokalen Konzentration an den Promotoren der *GAL*-Gene könnte daraus eine hohe konstitutive Expression resultieren. Die Interaktion zwischen *KGal1* und *KGal80* in Abwesenheit von Galaktose könnte unter diesen Bedingungen also ausreichend sein für eine Aufrechterhaltung des induzierten Zustandes. Nach dieser Hypothese sollte eine *gal1*-Deletion in diesem Stamm zu einem Verlust der konstitutiv hohen Expression der *GAL*-Gene führen.

In diesen Experimenten äußert sich einmal mehr die Sensitivität des Galaktose-Schalters in *K. lactis*. Zu dessen optimaler Funktion müssen die Konzentrationen der Regulatoren offenbar sehr fein und in engen Grenzen reguliert werden. Leichte Veränderungen der Konzentrationen oder Interaktionsparameter führen zu drastischen Phänotypen (s. dazu auch Abschnitte 3.4.1 und 3.4.2). Eine leichte Erhöhung der Konzentration von *KGal4* in Kombination mit einer Verhinderung der Autoregulation führt zu einer konstitutiven Induktion des *GAL*-Regulons und somit zum Verlust der Fähigkeit, in den nicht-induzierten Zustand zurückzukehren (dies wird erst unter reprimierenden Bedingungen durch Zugabe von Glukose erreicht; Zachariae, 1994). In vorherigen Arbeiten war gezeigt worden, dass die Ausprägung der Glukose-Repression in *K. lactis* sehr stark von der Konzentration an *KGal4* abhängig ist (Zachariae *et al.*, 1993; Zachariae, 1994). In Anwesenheit von Glukose und Galaktose muss ein gewisser Schwellenwert der *KGal4*-Konzentration zum Erreichen einer Induktion des *GAL*-Regulons überschritten werden. Hier konnte gezeigt werden, dass eine solche starke Abhängigkeit von der *KGal4*-Konzentration auch unter nicht induzierenden (und nicht reprimierenden) Bedingungen vorliegt.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Die intrazelluläre Lokalisation der Regulatoren

Die grundlegenden Mechanismen zur Regulation der *GAL*-Gene in Abhängigkeit von Galaktose sind zwischen den beiden Hefen *S. cerevisiae* und *K. lactis* sehr ähnlich (s. dazu Einleitung). In beiden Hefen wirkt das Galaktose-Signal über einen Schalter, welcher aus den drei Komponenten Gal4, Gal80 und Gal1 (bzw. primär Gal3 in *S. cerevisiae*) besteht.

Ein Punkt, in welchem sich die beiden Hefen hinsichtlich des Galaktose-Schalters unterscheiden, betrifft die intrazelluläre Lokalisation der Regulatoren. In *S. cerevisiae* ist ScGal3 (wahrscheinlich ausschließlich) cytoplasmatisch, ScGal80 hingegen sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert (Peng und Hopper, 2000; Peng und Hopper, 2002). Dies impliziert, dass ScGal3 und ScGal80 in *S. cerevisiae* im Cytoplasma miteinander interagieren und wahrscheinlich ist, dass diese Interaktion im Zuge der Galaktose-Induktion eine Reduktion der ScGal80-Konzentration im Kern bewirkt (Peng und Hopper, 2002). Die Bildung eines trimeren ScGal4-ScGal80-ScGal3-Komplexes im Kern wird in *S. cerevisiae* durch die Lokalisation der Regulatoren ausgeschlossen.

In *K. lactis* hingegen konnte KGal80 ausschließlich im Kern nachgewiesen werden, KGal1 hingegen ist sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert (s. Abschnitt 3.5 und die dortigen Referenzen). Wie in Abschnitt 3.5 gezeigt wurde, findet die Interaktion zwischen diesen beiden Regulatoren im Nukleus statt. Die verschiedenen Lokalisationen der Regulatoren aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* könnten eine Erklärung dafür bieten, dass eine *Klga1*-Deletion in *K. lactis* nur sehr schwach durch *ScGAL3* supprimiert werden kann (Zenke *et al.*, 1996). An dieser Stelle soll festgehalten werden, dass die Lokalisation der Regulatoren in *K. lactis* prinzipiell die Möglichkeit zur Formation eines trimeren KGal4-KGal80-KGal1-Komplexes offen lässt.

Zunächst mutet es überraschend an, dass das metabolische Enzym KGal1 unter anderem im Nukleus lokalisiert ist. Allerdings scheint KGal1 in Hinsicht auf die duale Lokalisation (Cytoplasma und Kern) eines Proteins mit dualer Funktion (metabolisch und regulatorisch) nicht einzigartig zu sein. Die Hexokinase 2 (Hxk2) aus *S. cerevisiae* z.B. besitzt, wie das KGal1-Protein, eine metabolische und eine regulatorische Funktion. In seiner Funktion als metabolisches Enzym initiiert es durch Phosphorylierung von Glukose dessen Verwertung. Zudem spielt Hxk2 eine wichtige Rolle in der Glukose-Repression (Moreno und Herrero, 2002). Dieses bifunktionelle Protein ist in *S. cerevisiae* (ähnlich wie KGal1 in *K. lactis*) ebenfalls sowohl im Cytosol als auch im Nukleus lokalisiert (Randez-Gil *et al.*, 1998); das Ausmaß der Kernlo-

kalisierung wird in diesem Fall unter anderem durch die Interaktion mit dem Mig1-Protein reguliert (Ahuatzi *et al.*, 2004).

Formal gesehen werden die beiden Funktionen von *KIGal1*, welche in *S. cerevisiae* durch zwei verschiedene Proteine übernommen werden, in *K. lactis* durch die duale Lokalisation des Proteins getrennt. Da die Interaktion zwischen *KIGal1* und *KIGal80* im Nukleus stattfindet, muss gewährleistet sein, dass Galaktose, welche die Bindung zwischen den beiden Proteinen verstärkt, in den Nukleus gelangen kann. Dies scheint auf den ersten Blick problematisch, da die große Menge von *KIGal1* im Cytoplasma (insbesondere im induzierten Zustand; s. dazu Abschnitt 3.6) dazu führen könnte, dass in die Zelle gelangte Galaktose vollständig vor dem Eintritt in den Zellkern enzymatisch umgesetzt wird. In diesem Zusammenhang könnte von entscheidender Bedeutung sein, dass *KIGal1* einen sehr hohen  $K_m$ -Wert für Galaktose besitzt (3,3 mM nach Engels, 1999; ca. 5 mM nach eigenen Messungen; Daten nicht gezeigt). Durch diesen hohen  $K_m$ -Wert könnte sichergestellt werden, dass cytoplasmatische Galaktose in großer Menge vor dem enzymatischen Umsatz in den Nukleus gelangt.

Eine noch offene Frage betrifft den Mechanismus der Kernlokalisierung von *KIGal1*. In der Literatur (und durch versuchte Prädiktion mit diversen Tools im Internet) konnten keine Anhaltspunkte für eine möglicherweise vorhandene Kernlokalisationssequenz gefunden werden. Ein nahe liegender Mechanismus könnte darin bestehen, dass *KIGal1* zusammen mit *KIGal80* in den Kern transportiert wird (sozusagen „Huckepack“). Diese Hypothese erscheint mir jedoch aus folgenden Gründen unwahrscheinlich. i) In den in Abschnitt 3.5 vorgestellten Lokalisationsstudien konnte in einer *Klga180*-Mutante kein Kernausschluss des GFP-*KIGal1*-Proteins nachgewiesen werden. ii) Die Simulationen mit den mathematischen Modellen (ab Abschnitt 3.7.4) legen nahe, dass im Kern zum Erreichen einer hohen Aktivität des Galaktose-Schalters im induzierten Zustand ein Überschuss von *KIGal1* gegenüber *KIGal80* vorhanden sein muss (ca. 2-3 fach). Solch ein Überschuss von *KIGal1* gegenüber *KIGal80* im Kern könnte prinzipiell auch nach dem „Huckepack“-Modell unter Hinzuziehen weiterer Annahmen (wie z.B. Shuttling von *KIGal80* oder verschiedene Degradationsraten beider Proteine im Kern) erreicht werden, die einfachste Annahme besteht jedoch darin, dass *KIGal1* unabhängig von *KIGal80* in den Kern transportiert wird. iii) Wäre die Kernlokalisierung von *KIGal1* ausschließlich an den Kerntransport von *KIGal80* gebunden, so sollte das Verhältnis zwischen *KIGal1* und *KIGal80* im Kern, wegen des hohen Überschusses von *KIGal1* in der Zelle (gemeint ist die absolute Menge in der Zelle), über einen weiten Konzentrationsbereich von *KIGal80* konstant bleiben können. Eine erhöhte Konzentration von *KIGal80* sollte demzufolge keinen derart großen Einfluss auf die Galaktose-Induktion haben können, wie er z.B. in Abschnitt 3.4.2 gezeigt wurde.

Aus den hier dargelegten Gründen favorisiere ich ein Modell, nach welchem *KIGal1* unabhängig von *KIGal80* in den Kern gelangt.

#### 4.2. Der molekulare Mechanismus des Galaktose-Schalters und Implikationen für seine mathematische Modellierung

Es gilt heute als gesichert, dass die Interaktionen zwischen den Regulatoren des Galaktose-Schalters (Gal4, Gal80, Gal1/Gal3) dessen Aktivität bestimmen. Dennoch ist nicht vollends geklärt, was genau diese Interaktionen bewirken. Wie in der Einleitung dargelegt, wurden in der Vergangenheit verschiedene Modelle zur molekularen Funktionsweise des Galaktose-Schalters vorgeschlagen. Aus mechanistischer Sicht stellen sich unter anderem die Fragen, ob die Bindung von Gal1/Gal3 an Gal80 zur Formation eines trimeren Gal4-Gal80-Gal1/Gal3-Komplexes führt oder ob die Bindung von Gal80 an die Regulatoren eine allosterische Konformationsänderung dieses Proteins beinhaltet. Es sollte beachtet werden, dass dies zwei Fragen aus verschiedenen Kategorien sind.

Aus mathematischer Sicht (also für die Modellierung) ist insbesondere die Frage wichtig, ob dem Galaktose-Schalter ein kompetitiver Mechanismus zu Grunde liegt und im Falle des Vorliegens, durch welche Parameter diese Konkurrenz beschrieben werden kann. Der in dieser Arbeit häufig verwendete Terminus „kompetitiv“ ist seiner Bedeutung nach an die Verwendung dieses Begriffes in der Enzymkinetik angelehnt, womit hier eine Art der Inhibierung der enzymatischen Aktivität eines Enzyms durch einen Inhibitor beschrieben wird. Der häufigste (und konzeptionell einfachste) Mechanismus einer kompetitiven Inhibierung besteht in einer direkten Konkurrenz zwischen Substrat und Inhibitor um die Bindung an das aktive Zentrum eines Enzyms. Kompetitive Inhibierung kann aber auch in allosterischen Enzymen auftreten, in welchen der Inhibitor an eine vom aktiven Zentrum verschiedene Stelle des Enzyms bindet (diese Bindestelle wird dann allosterische Bindestelle genannt), was zu einer konformellen Änderung des Enzyms und damit zu einer veränderten Bindung des Substrats führt (Literatur dazu z.B. unter <http://www.plantphys.net/pdf/ch2.pdf>; S. 18f). Das grundlegende Prinzip einer kompetitiven Inhibierung ist, dass die Aktivität des Enzyms abhängig ist von den relativen Konzentrationen von Substrat und Inhibitor (und natürlich ihren relativen Affinitäten zum Enzym), dass also der Effekt des Inhibitors durch das Substrat (z.B. durch höhere Konzentrationen) aufgehoben werden kann. Der Inhibitor ändert somit nicht die maximale Umsatzrate ( $v_{\max}$ ) des Enzyms, sondern dessen apparenten  $K_m$ -Wert für das Substrat. Auf die Proteine des Galaktose-Schalters übertragen heißt das, dass die Bindungspartner von Gal80, Gal4 bzw. Gal1/Gal3, die apparente Affinität dieses Proteins zum jeweils anderen Bindungspartner verringern. Obwohl die einfachste Erklärung einer beobachteten Konkurrenz (wie sie z.B. in dieser Arbeit gezeigt wurde) in der Annahme einer direkten Konkurrenz besteht, kann eine allosterische Konformationsänderung von Gal80 prinzipiell nicht ausgeschlossen werden. Im Falle einer reversiblen und schnellen Konformationsänderung von Gal80 wäre jedoch ein mathematisches Modell zur Beschreibung dieser auf Al-

losterie beruhenden Konkurrenz identisch mit einem Modell unter der Annahme einer direkten Konkurrenz. Theoretisch sollte ein kompetitiver Mechanismus vorliegen, sofern man fordert, dass im Zuge der Galaktose-Induktion die Gal4-AD die Transkription aktiviert, denn in diesem Fall muss gegen die Bindung zwischen Gal4-AD und Gal80 kompetiert werden. In seiner ausgeprägtesten Form geht ein kompetitives Modell in ein reines Dissoziationsmodell über, nach welchem sich die Interaktionen von Gal80 mit Gal1/Gal3 bzw. Gal4 gegenseitig ausschließen.

Im Gegensatz zum kompetitiven muss ein nicht-kompetitives Modell fordern, dass sich die Interaktionen von Gal80 mit Gal1/Gal3 und Gal4 gegenseitig in ihrer Stärke nicht beeinflussen. Nach einem solchen Modell muss ein stabiler trimerer Komplex gebildet werden können, in welchem die Stabilität der Bindungen von Gal80 an die einzelnen Bindungspartner der Stabilität der Einzelbindungen ohne den jeweils anderen Bindungspartner entspricht.

Die Frage nach dem Vorliegen von Konkurrenz lässt sich auf verschiedenen Wegen experimentell beantworten. Zum einen sollte die Anwesenheit von Gal1/Gal3 Galaktose- (und ATP-) abhängig zu einer Destabilisierung des Komplexes bestehend aus Gal80 und Gal4 (insbesondere dessen AD) führen. Scheinbar im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse von Platt und Reece (1998). Diese Autoren konnten *in vitro* die Formation eines trimeren ScGal4-ScGal80-ScGal3 Komplexes nachweisen. Hier sollte jedoch beachtet werden, dass die Experimente nicht darauf ausgelegt waren, die Stabilität der Interaktion zwischen Gal4 und Gal80 in Abhängigkeit von Gal3 zu verfolgen. Es wurde lediglich gezeigt, dass *in vitro* die Formation eines trimeren Komplexes möglich ist. Inwiefern die Stabilität der Gal4-Gal80-Interaktion durch die Bindung von Gal3 beeinflusst wird, war in den Experimenten nicht untersucht worden. Dieser Fragestellung sind Sil *et al.* (1999) nachgegangen, wobei die Autoren zeigen konnten, dass *in vitro* ScGal3 in Abhängigkeit von Galaktose (und ATP) die Bindung zwischen ScGal80 und ScGal4 (bzw. ScGal4-AD) destabilisiert. Zur Vereinigung dieser Daten mit den Ergebnissen von Platt und Reece (1998) wurde von den Autoren ein „two site model“ vorgeschlagen (s. dazu auch Einleitung). Nach diesem Modell können Gal4 und Gal80 durch jeweils zwei verschiedene Epitope miteinander interagieren und Gal3 kompetiert ausschließlich gegen die „klassische“ Interaktion zwischen Gal80 und der Aktivierungsdomäne von Gal4. Im Grunde ist dies also ein kompetitives Modell, wobei die Bindung von Gal3 und Gal80 nicht zu einer vollständigen Dissoziation des Gal4-Gal80-Komplexes, sondern zu seiner Destabilisierung führt. Betrachtet man in diesem Modell lediglich die Aktivierungsdomäne von Gal4, so liegt ein reines Dissoziationsmodell vor. Solch ein Modell könnte erklären, dass in den Experimenten von Platt und Reece (1998) zur Formation des trimeren Komplexes ein sehr hoher Überschuss von Gal3 gegenüber Gal80 erforderlich war, denn zur Forcierung dieser Komplexbildung müsste Gal3 gegen die (sehr affine) Bindung zwischen Gal4-AD und Gal80 konkurrieren.

Das Vorliegen kompetitiver Interaktionen zwischen den Regulatoren muss neben einer Gal1/Gal3-abhängigen Destabilisierung der Gal4-Gal80-Interaktion auch zu einer Gal4(-AD)-abhängigen Destabilisierung des Gal1/Gal3-Gal80-Komplexes führen. Diese Art der Kompetition konnte für die Regulatoren aus *K. lactis* in der hier vorliegenden Arbeit (Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4) nachgewiesen werden. Das hier vorgestellte Galaktokinase-Inhibierungsexperiment bietet zudem die Möglichkeit zur Quantifizierung der Parameter der Kompetition. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Interpretation der Ergebnisse dieses Experimentes auf der Annahme beruht, dass enzymatisch aktives *K/Gal1* identisch ist mit freiem (nicht an *K/Gal80* gebundenem) *K/Gal1*. Formal kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch *K/Gal80*-gebundenes *K/Gal1* enzymatisch aktiv sein kann, dann müsste man allerdings die (unwahrscheinliche) Annahme treffen, dass beide Proteine in einem zweiten Modus miteinander interagieren können, da einer der Interaktionsmodi eindeutig mit einer Inhibierung der *K/Gal1*-Aktivität verbunden ist. Sogar bei Zutreffen dieser Annahme würde man mit den vorgestellten Experimenten die für den Induktionsprozess relevante Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* messen, da diese durch die Gal4-AD beeinflusst wird und demzufolge auch die Interaktion zwischen Gal4-AD und *K/Gal80* beeinflusst.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse lassen (unter obiger Annahme) den Schluss zu, dass sich die Interaktionen zwischen *K/Gal80* und Gal4-AD einerseits bzw. *K/Gal80* und *K/Gal1* andererseits gegenseitig nicht nur destabilisieren, sondern ausschließen. In Abschnitt 3.2.4 dieser Arbeit wurde gezeigt, dass miniScGal4 die *K/Gal80*-abhängige Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* vollständig aufheben kann. Zudem können die Ergebnisse der Experimente mit miniScGal4 und synthetischem Peptid (*K/Gal4-AD*) mathematisch auf der Basis eines reinen Dissoziationsmodells reproduziert werden (Abschnitt 3.2.5). Dies schließt nicht aus, dass (insbesondere mit *K/Gal4*-Volllängenprotein) ein *K/Gal4-K/Gal80-K/Gal1*-Komplex gebildet werden kann („two site model“; s. oben); die intrazelluläre Lokalisation der Regulatoren in *K. lactis* würde dies prinzipiell zulassen. Sofern man jedoch annimmt, dass die Aktivierung der *GAL*-Gene im Zuge der Galaktose-Induktion durch die Aktivierungsdomäne von *K/Gal4* erfolgt (diese also freigesetzt werden muss), so bestünde auch in diesem Fall der für die Aktivierung des Galaktose-Schalters relevante Mechanismus in der auf einem reinen Dissoziationsmodell beruhenden Kompetition zwischen der *K/Gal4-AD* und *K/Gal1* um die Bindung an *K/Gal80* [denn ein trimerer Komplex aus (*K/Gal4*-Aktivierungsdomäne, *K/Gal80* und *K/Gal1* kann offenbar nicht gebildet werden)].

*In vitro* liegt also ganz klar eine Kompetition zwischen der Gal1/Gal3-Gal80-Interaktion einerseits und der Gal4(AD)-Gal80-Interaktion andererseits vor. *In vivo* sollte sich das Vorliegen eines kompetitiven Mechanismus als Grundlage des Galaktose-Schalters unter anderem

dadurch äußern, dass solch ein Mechanismus sehr sensitiv auf Veränderungen von Regulator-Konzentrationen und Interaktionsparametern reagieren kann. Die in den Abschnitten 3.4.1 und 3.4.2 dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass eine leichte Veränderung der *K/Gal80*-Konzentration oder der Affinität von *K/Gal80* zu *K/Gal1* jeweils sehr drastische Effekte auf die Galaktose-Induktion haben und stützen somit die Annahme, dass in *K. lactis* der Mechanismus des Galaktose-Schalters auch *in vivo* auf einer Konkurrenz zwischen *K/Gal1-K/Gal80* und *K/Gal4(AD)-K/Gal80*-Bindung beruht. Ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen eines kompetitiven Mechanismus in *S. cerevisiae* ist die Tatsache, dass der super-reprimierte Phänotyp, welchen das Allel *Scgal80-s1* hervorruft, durch Kombination mit einem bestimmten *Scgal4*-Allel (*gal4-Ile859*) supprimiert werden kann (Salmeron *et al.*, 1990). Die einfachste Erklärung dieses Phänomens ist, dass *ScGal80-S1* mit erhöhter Affinität an *ScGal4* bindet, wodurch der entsprechende Stamm mit diesem *gal80*-Allel die Fähigkeit zur Galaktose-Induktion verliert (da *Gal3* gegen diese verstärkte Interaktion nicht mehr effektiv kompetieren kann). Wird die Affinität zwischen Aktivator und Inhibitor in diesem Stamm durch Einbringung des Allels *gal4-Ile859* sekundär wieder erniedrigt, dann führt dies zur Supprimierung des super-reprimierten Phänotyps. Auch hier bewirken also Veränderungen an den Affinitäten zwischen den Regulatoren sehr drastische Phänotypen.

Es gibt weitere experimentelle Befunde, welche nahe legen, dass dem Galaktose-Schalter in *S. cerevisiae in vivo* ein kompetitiver Mechanismus zu Grunde liegt: (i) *Gal3* scheint in *S. cerevisiae* ausschließlich cytoplasmatisch vorzuliegen, wohingegen *Gal80* sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert ist (Peng und Hopper, 2000; Peng und Hopper, 2002). (ii) Von Peng und Hopper (2002) konnte durch ChIP-Experimente gezeigt werden, dass im Zuge der Galaktose-Induktion die Assoziation von *ScGal80* mit den Promotoren der *GAL*-Gene reduziert wird (Peng und Hopper, 2002). (iii) Entsprechend konnten Bhaumik *et al.* (2004) zeigen, dass *in vivo* die Induktion der *GAL*-Gene mit einer Verringerung der Interaktion zwischen *Gal4-AD* und *Gal80* verbunden ist.

Hier stellt sich die Frage, weshalb in den Experimenten von Leuther und Johnston (1992) eine solche Destabilisierung des *ScGal4-ScGal80*-Komplexes nicht feststellbar war. Diese Experimente zeigten die Beständigkeit einer *ScGal4-ScGal80*-Zweihybrid-Interaktion während der Galaktose-Induktion. Meines Erachtens könnte dieser Befund auf der künstlichen Verstärkung der *Gal4-Gal80*-Interaktion an den Promotoren beruhen, welche durch veränderte Interaktionen mit der Transkriptionsmaschinerie bewirkt worden war. In den Versuchen wurden *Gal4*-Proteine verwendet, welche von sich aus nicht zur Transkriptionsaktivierung befähigt sind. Die Aktivierung erfolgte in dem Fall durch Interaktion dieser modifizierten *Gal4*-Proteine mit einem *Gal80-VP16*-Fusionsprotein, was folgende Konsequenzen haben kann: i) Die Unfähigkeit der verwendeten *Gal4*-Varianten zur Aktivierung der Transkription führt zu einem Wegfall der normalerweise vorliegenden Konkurrenz zwischen *Gal80* und Komponenten

ten der Transkriptionsmaschinerie um die Bindung an die Aktivierungsdomäne von Gal4 (Ansari *et al.*, 1998; Carrozza *et al.*, 2002). ii) Die in diesem Fall an Gal80 fusionierte Aktivierungsdomäne könnte eine kooperative Bindung mit der Transkriptionsmaschinerie an die DNA vermitteln (die Aktivierungsdomäne von Gal4 kann dies bewirken; Vashee und Kodadek, 1995) und somit letztlich eine Stabilisierung des am Promotor gebundenen Gal4-Gal80-Komplexes. In der Summe würden Prozesse, welche *in vivo* normalerweise der Interaktion zwischen Gal4-AD und Gal80 entgegenwirken, unter den gewählten experimentellen Bedingungen zu einer Verstärkung dieser Interaktion führen, was erklären könnte, dass Gal3 gegen diese derart stabilisierte Interaktion nicht mehr kompetieren kann.

Das Vorliegen eines kompetitiven Mechanismus als Basis des Galaktose-Schalters in *K. lactis* und *S. cerevisiae* wird sowohl von den *in-vitro*-, als auch der Mehrheit der *in-vivo*-Daten gestützt. Wie oben erwähnt, lässt sich daraus nicht ableiten, inwiefern die Konkurrenz mit einer allosterischen Konformationsänderung von Gal80 verbunden ist. Für den Fall einer direkten Konkurrenz (also ohne allosterische Transformation) sind die Parameter der Interaktionen zwischen den Regulatoren zur quantitativen Beschreibung der Konkurrenz (wie sie in dieser Arbeit vorgestellt wurde) ausreichend. Dies gilt auch für den Fall, dass die putativen allosterischen Konformationsänderungen von Gal80 schnell und reversibel sind. Eine Ausnahme bestünde, sofern eine Konformationsänderung sehr langsam bzw. irreversibel ist. Dann wäre die Wirkung eines Regulators auf Gal80 nicht mehr stöchiometrisch (wie es im Fall einer direkten Konkurrenz immer sein muss), sondern entspräche in etwa einer enzymatischen Wirkung. Die in dieser Arbeit vorgestellten Inhibierungsexperimente geben keinen Hinweis auf eine solche pseudo-enzymatische Wirkung. Soweit dies getestet wurde, hatte z.B. eine lange Präinkubation von *K*Gal80 mit einem seiner Bindungspartner keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Auch die in Abschnitt 3.3.5 vorgestellten Ergebnisse, welche einen Einfluss der Präinkubationszeit von *K*Gal80 mit *K*Gal80-S2 zeigten, sind kompatibel mit der Annahme, dass in diesem Fall lediglich die Einstellung des Gleichgewichtes der Interaktionen sehr langsam ist.

Zusammengenommen sind alle in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse vollständig kompatibel mit der Annahme, dass dem Galaktose-Schalter (zumindest in *K. lactis*) ein auf direkter Konkurrenz zwischen den Regulatoren beruhendes Dissoziationsmodell zu Grunde liegt und ein solches Modell wird von mir klar favorisiert. Die direkte Konkurrenz könnte auf einer Überlappung der Bindestellen von *K*Gal1 und Gal4-AD auf *K*Gal80 und/oder auf einer sterischen Behinderung der beiden Interaktionen beruhen. Läge *in vivo* in *K. lactis* eine partielle Dissoziation vor, also gäbe es eine alternative Interaktion zwischen dem *K*Gal4-Vollängenprotein und *K*Gal80, welche durch die Bindung von *K*Gal1 nicht beeinflusst würde

(dieses Modell entspricht dem „two site model“; s. oben), so bliebe meines Erachtens der relevante Mechanismus für die Aktivierung von *K/Gal4* die in dieser Arbeit gezeigte und quantifizierte Konkurrenz zwischen der Gal4-AD und *K/Gal1* um die Bindung an *K/Gal80* auf der Basis eines reinen Dissoziationsmodells. Wäre die Konkurrenz mit einer allosterischen Konformationsänderung von *K/Gal80* (wofür es keine Hinweise gibt) verbunden, so sollte deren Vernachlässigung in den mathematischen Modellen (sofern keine pseudoenzymatische Wirkung vorliegt) die Simulationsergebnisse nicht signifikant beeinflussen können.

Die in dieser Arbeit im Modellierungsteil vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Annahme eines auf direkter Konkurrenz beruhenden Dissoziationsmodells als Basis des Galaktose-Schalters in *K. lactis* ausreichend ist zur Konstruktion eines effizienten Schaltmechanismus.

#### 4.3. Die Multimerisierung von *K/Gal80* und der Einfluss von Citrat und EDTA

Wie in Abschnitt 3.3.1 dargelegt wurde, besitzt *K/Gal80* die Fähigkeit zur Multimerisierung. Im Verlauf der Arbeit konnte festgestellt werden, dass Citrat und EDTA eine dimere Form von *K/Gal80* stabilisieren. Bei genügend hohen Konzentrationen dieser Agenzien kann ein Multimer höherer Ordnung nicht mehr detektiert werden. Die experimentellen Daten legen nahe, dass es sich bei dem Multimer höherer Ordnung um ein Tetramer handelt. Sofern man annimmt, dass *K/Gal80* ähnlich wie *ScGal80* (Melcher und Xu, 2001) tetramersieren kann, dann ist es prinzipiell möglich, dass in Lösung zwei verschiedene dimeren Formen von *K/Gal80* existieren können. Die Tatsache, dass Citrat und EDTA das Protein vollständig in die dimere Form überführen können, deutet darauf hin, dass zumindest unter diesen Bedingungen *K/Gal80* homogen in nur einer einzigen dimeren Form vorliegt. Es ist äußerst unwahrscheinlich, dass diese Agenzien beide Arten der Selbstinteraktion von *K/Gal80* beeinflussen (behindern), denn in diesem Fall sollte *K/Gal80* in Anwesenheit von Citrat oder EDTA in monomerer Form vorliegen (zumindest sollte das Monomer in signifikanter Menge vorliegen).

Die zwei Formen der Selbstinteraktion von *K/Gal80* scheinen qualitativ (und auch quantitativ) verschieden zu sein. Die Stabilisierung der einen dimeren Form in Anwesenheit von Citrat und EDTA (sofern im Folgenden von „Dimer“ die Rede ist, ist genau diese dimere Form gemeint) geht einher mit einer Stabilisierung des Proteins in Lösung; durch die Zugabe von Citrat oder EDTA kann die Präzipitation von *K/Gal80* verhindert werden (s. Abschnitt 3.1.1). Das Auftreten des Multimers höherer Ordnung (und damit das Auftreten der „anderen“ Selbstinteraktion von *K/Gal80*) jedoch korreliert mit einer Instabilität des Proteins. Möglich

wäre demnach, dass die Bildung der multimeren Form höherer Ordnung (putatives Tetramer) nicht auf spezifischer Bindung zwischen den *K/Gal80*-Untereinheiten beruht, sondern eher durch (unspezifische) Aggregation hervorgerufen wird. Möglich wäre auch, dass diese Form durch spezifische Bindung gebildet wird, aber eine Vorstufe der Aggregaten darstellt bzw. diese unterstützt.

Unter Bedingungen, welche die Bildung des putativen Tetramers zulassen, kann *K/Gal80* im Gelfiltrationsexperiment generell über einen sehr weiten Elutionsbereich detektiert werden. Unter solchen Bedingungen wird das Protein sowohl bei niedrigeren als auch bei höheren Elutionsvolumina (als es dem Dimer entspricht) eluiert. Dies konnte anhand von Westernanalysen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt) und ist zum Teil auch aus den dargestellten Abbildungen (s. z.B. Abb. 9) ersichtlich. Das Elutionsprofil ist in diesen Fällen eher diffus, erst bei genügend hohen Konzentrationen können die beschriebenen zwei Peaks (Dimer und putatives Tetramer) detektiert werden. EDTA und Citrat führen demnach nicht nur zu einer bloßen Verhinderung des Multimers höherer Ordnung, sondern allgemeiner zu einer Stabilisierung der dimeren Form (und damit des Proteins insgesamt). Zusammengenommen deuten die Daten darauf hin, dass in Abwesenheit von Citrat und EDTA prinzipiell die Integrität von *K/Gal80* gestört ist. Diese postulierte Störung der Integrität scheint, zumindest partiell, reversibel zu sein. Die in Abbildung 11 (s. Abschnitt 3.3.2) dargestellten Versuche wurden mit einer Präparation von *K/Gal80* durchgeführt, welche zuvor gegen einen Puffer mit 1 mM EDTA dialysiert wurde. Wird dieser Puffer als Laufpuffer im Gelfiltrationsexperiment verwendet (mit Zugabe von 60 mM NaCl zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen mit der Säulenmatrix), so zeigt sich, dass das Protein unter diesen Bedingungen offenbar nur zu einem Bruchteil in dimerer Form vorliegt (oberes Elutionsprofil in Abb. 11). Bei Benutzung der gleichen Proteincharge und eines Laufpuffers mit 30 mM EDTA kann wiederum vorrangig das *K/Gal80*-Dimer detektiert werden (zweites Elutionsprofil in Abb. 11). Offenbar führen also die Pufferbedingungen zu einer Rekonstitution der dimeren Form auf der Gelfiltrationssäule.

Worauf könnte der Effekt von Citrat und EDTA beruhen? Wie schon in Abschnitt 3.3.1 dargelegt, war zunächst vermutet worden, dass der Effekt auf der Chelatierung eines (z.B. als Verunreinigung im Wasser enthaltenen) Metallions beruht. Konkurrenzexperimente zur Identifizierung dieses Metallions zeigten, dass  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  keinen Einfluss auf den Effekt von EDTA haben,  $Zn^{2+}$  hingegen führt zur Aufhebung des EDTA-Effektes und zu einem Verlust der Integrität des *K/Gal80*-Proteins (s. Abb. 11). Prinzipiell sind diese Ergebnisse kompatibel mit der Annahme, dass der Effekt von EDTA auf der Chelatierung eines Metallions (z.B.  $Zn^{2+}$  selbst) beruht. Bei genauerer Betrachtung allerdings scheint diese Annahme sehr unwahrscheinlich.

Zum einen ist EDTA relativ ineffektiv bei der Stabilisierung des Dimers. EDTA ist ein sehr

potenter Chelator und wird in der Regel zum Austitrieren unerwünschter Metallionen in einer Konzentration von 1 mM (oder weniger) eingesetzt. Zur Stabilisierung des *K/Gal80*-Dimers waren höhere Konzentrationen notwendig (s. z.B. Abb. 10; hier waren 10 mM EDTA nicht ausreichend zur vollständigen Überführung in die dimere Form). Um diese Daten zu erklären, müsste man annehmen, dass *K/Gal80* selbst sehr effektiv mit EDTA um die Bindung des putativen Metallions kompetiert, dass also die Bindung des Metallions an *K/Gal80* mit ähnlich hoher Affinität erfolgt wie die Bindung an EDTA.  $\text{Ca}^{2+}$  besitzt zu EDTA eine Affinität von ca. 20 pM (s. Tab. 4), kann allerdings dessen Effekt auf *K/Gal80* nicht aufheben. Demzufolge müsste das putative Metallion mit höherer Affinität als 20 pM an EDTA binden. *K/Gal80* müsste demnach ebenfalls eine sehr hohe Affinität zu dem Metallion besitzen. Eine solch hochaffine Bindung ist schwer vereinbar mit dem Befund, dass die postulierte Bindung dieses Metallions eher zu einer Störung der Integrität von *K/Gal80* führt.

Eine Wirkung von EDTA über die Chelatierungsfunktion wird insbesondere durch den Befund in Frage gestellt, dass Citrat hinsichtlich der Stabilisierung des *K/Gal80*-Dimers ähnlich effektiv ist wie EDTA. Dies ist insofern bezeichnend, als EDTA ein wesentlich potenterer Chelator als Citrat ist. In Tabelle 4 sind die Affinitäten einiger Metallionen zu EDTA und Citrat aufgeführt. Es wird deutlich, dass EDTA zu den aufgelisteten Metallionen eine jeweils um mehrere Größenordnungen höhere Affinität besitzt als Citrat.

Tabelle 4. Affinitäten ausgewählter zweiwertiger Metallionen zu EDTA und Citrat.

Metallion	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Fe}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$
$K_D$ (M) zu EDTA	$2,0 \cdot 10^{-9}$	$2,0 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{-14}$	$4,8 \cdot 10^{-15}$	$5,0 \cdot 10^{-17}$	$3,4 \cdot 10^{-17}$	$3,1 \cdot 10^{-17}$	$2,4 \cdot 10^{-19}$	$1,6 \cdot 10^{-19}$
$K_D$ (M) zu Citrat	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-5}$	k.A.	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$7,9 \cdot 10^{-7}$

Die Daten wurden aus dem Internet unter [http://www.coldcure.com/html/stability\\_constants.html](http://www.coldcure.com/html/stability_constants.html) übernommen.  
k.A.: keine Angabe.

Zusammenfassend müsste also ein in Frage kommendes Metallion, welches für den destabilisierenden Effekt auf *K/Gal80* verantwortlich zeichnet, folgenden Anforderungen genügen: Es müsste eine höhere Affinität zu EDTA besitzen als  $\text{Ca}^{2+}$  und ähnlich stark an Citrat binden können. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist es mir nicht gelungen, ein derartiges Metallion zu identifizieren. Die Annahme, dass der Effekt von Citrat und EDTA auf der Chelatierung eines Metallions beruht, scheint mir daher sehr unwahrscheinlich zu sein.

Aus diesem Grund tendiere ich eher zu der Annahme, dass der Effekt von EDTA und Citrat auf einer unspezifischeren Wirkung dieser beiden Agenzien beruht. Verschiedentlich ist zu lesen (s. z.B. unter <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edtah.htm>), dass EDTA ein schwa-

ches anionisches Tensid darstellt. Möglich wäre demnach, dass EDTA (bzw. Citrat) seinen Effekt auf *K/Gal80* ausübt, indem es hydrophobe Bereiche des Proteins gegen die wässrige Umgebung abschirmt. Würde die Bildung des Multimers höherer Ordnung auf einer hydrophoben Interaktion dieser postulierten hydrophoben Oberflächen beruhen, so wäre dies eine Erklärung dafür, dass EDTA (bzw. Citrat) das Protein stabilisiert und gleichzeitig die Bildung des putativen Tetramers verhindert. Die hier geäußerte Hypothese könnte einen plausiblen Erklärungsansatz bieten für die Beobachtungen, dass (i) die Effekte von EDTA und Citrat gleichermaßen relativ schwach sind, (ii) in Abwesenheit dieser Agenzien Multimere höherer Ordnung von *K/Gal80* auftreten und (iii) das Auftreten dieser Multimere mit einer Instabilität des Proteins *in vitro* korreliert. Es wäre daher zu prüfen, ob auch andere (schwache) Tenside zu einer Stabilisierung des *K/Gal80*-Proteins (und der dimeren Form) befähigt sind.

#### 4.4. Der Modus der Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80*

Unter der Annahme, dass dem Mechanismus des Galaktose-Schalters in *K. lactis* ein auf direkter Konkurrenz beruhendes reines Dissoziationsmodell zu Grunde liegt, schien zunächst problematisch, dass die ermittelte apparente Affinität zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* wesentlich geringer ist als jene zwischen *Gal4* und *K/Gal80*. In bereits veröffentlichten Arbeiten zur mathematischen Modellierung des Galaktose-Schalters in *S. cerevisiae* war stets angenommen worden, dass *Gal3* und *Gal80* mit sehr hoher Affinität interagieren ( $K_{D,app}=0,063$  nM; Verma *et al.*, 2003, 2004). Die Affinität zwischen *ScGal3* und *ScGal80* ist bislang nicht bestimmt worden, es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch diese im Vergleich zur Stärke der *ScGal4-ScGal80*-Interaktion relativ gering ist. In den Experimenten von Platt und Reece (1998) zum Beispiel war zur Aktivierung von *ScGal4* in *in-vitro*-Transkriptionsexperimenten ein sehr hoher molarer Überschuss (ca. 30fach) von *ScGal3* gegenüber *ScGal80* notwendig.

Ein Unterschied der oben erwähnten mathematischen Modelle (Verma *et al.*, 2003, 2004) zu dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell besteht in der Annahme eines Modus der *ScGal3-ScGal80*-Interaktion, nach welchem *ScGal3* gegen die Dimerisierung von *ScGal80* kompetiert. Vereinfachend gesagt, muss *ScGal3* nach dieser Modellvorstellung sowohl gegen die *ScGal4-ScGal80*-Bindung (indirekt) als auch gegen die *ScGal80*-Dimerisierung (direkt) kompetieren. Beide Interaktionen erfolgen mit sehr hoher Affinität (Melcher und Xu, 2001), weswegen bei Annahme dieses Interaktionsmodus zum Erreichen einer hohen Schaltereffizienz auch für die Bindung zwischen *ScGal3* und *ScGal80* eine hohe Affinität angenommen werden muss.

In einer neueren Arbeit ist genau dieser Modus der Interaktionen zwischen den Regulatoren aus *S. cerevisiae* vorgeschlagen worden (Pilauri *et al.*, 2005). Ziel der Arbeit war die Identifikation von Punktmutationen in *ScGAL80*, welche die Bindungen von *ScGal80* an *ScGal3* und die *ScGal4*-AD beeinträchtigen. Die meisten *Gal80*-Varianten, welche auf Grund einer Beeinträchtigung der Bindung an die *Gal4*-AD selektiert worden waren, zeigten kaum Defekte in der Selbstinteraktion und der Bindung an *Gal3*. Im Gegensatz dazu waren die meisten Varianten, welche wegen einer Beeinträchtigung der Bindung an *ScGal3* selektiert worden waren, auch in der Selbstinteraktion (und der Bindung an die *Gal4*-AD) gestört. Daraus schlossen die Autoren, dass in der zweiten Klasse der Varianten teilweise Aminosäuren betroffen sind, welche Determinanten für die Bindung an *Gal3* und die Selbstinteraktion darstellen. Unter Hinzuziehung der Daten von Timson *et al.* (2002), welche eine Monomer-Monomer-Interaktion zwischen *ScGal3* und *ScGal80* nahe legten, folgerten die Autoren, dass die Dimerisierung von *ScGal80* gegen die Bindung an *ScGal3* kompetiert. Dies ist eine mögliche Interpretation der Ergebnisse. Allerdings sollte hier berücksichtigt werden, dass es offenbar eine ausgeprägte Eigenschaft des *ScGal80*-Proteins ist, strukturell sehr sensitiv auf Austausch einzelner Aminosäuren zu reagieren. Sehr häufig führt die Substitution einer einzigen Aminosäure zu simultanen Beeinträchtigungen der Interaktionen von *ScGal80* mit allen seinen Bindungspartnern (Selbstinteraktion, Bindung an *ScGal3* und *ScGal4*-AD) und seiner strukturellen Integrität (Melcher, 2005).

Die Tatsache, dass die Ergebnisse von Gelfiltrationsexperimenten eine Monomer-Monomer-Interaktion zwischen *ScGal3* und *ScGal80* nahe legten (Timson *et al.*, 2002), schließt die Bindung von *ScGal3* an das *ScGal80* Dimer nicht aus. Der Nachweis der höhermolekularen Komplexe mittels der Technik der Gelfiltration könnte erschwert werden, sofern diese Komplexe über die Dauer eines Experimentes unbeständig (kinetisch instabil) sind. Dies könnte insbesondere dann der Fall sein, wenn die Versuche unter Bedingungen stattfinden, unter denen das *ScGal80* Dimer nicht stabil ist (wie bei Timson *et al.*, 2002). Hier soll darauf verwiesen werden, dass auch in dieser Arbeit durch Gelfiltrationsexperimente kein höhermolekularer *KiGal1*-*KiGal80*-Komplex nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.3.3); diese Experimente fanden ebenfalls unter Bedingungen statt, unter denen das *KiGal80* Dimer nicht stabil war.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Annahme, dass die Bindung von *KiGal1* gegen die Dimerisierung von *KiGal80* kompetiert. Die Affinität der Dimerisierung von *KiGal80* ist zwar nicht systematisch quantifiziert worden, sie scheint aber relativ hoch zu sein. In AUZ-Experimenten lag *KiGal80* in Anwesenheit von Citrat bei einer Konzentration von ca. 200 nM noch vollständig in dimerer Form vor (Lilie; persönliche Mitteilung; das Detektionslimit verhinderte eine weitere Verringerung der Konzentration), demzu-

folge liegt der  $K_D$ -Wert der Dimerisierung weit unter 200 nM. Eine gegen die *K/Gal1*-Bindung gerichtete Konkurrenz dieser Stärke hätte sich in den Galaktokinase-Inhibierungsexperimenten dadurch äußern müssen, dass durch hohe *K/Gal80*-Konzentrationen keine vollständige Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* erreicht werden kann. Zudem wurde in Abschnitt 3.3.3 dieser Arbeit gezeigt, dass *K/Gal1* an eine dimere Form von *K/Gal80* binden kann und äquimolare Konzentrationen dieser beiden Proteine zur Bildung eines Heterotetramers führen. Diese Ergebnisse stehen im deutlichen Widerspruch zur Hypothese der Konkurrenz zwischen der Dimerisierung von *K/Gal80* und der Bindung an *K/Gal1*.

Ein weiteres Argument zugunsten eines Modus, nach welchem *K/Gal1* an das *K/Gal80*-Dimer binden kann, kommt aus der mathematischen Modellierung des Galaktose-Schalters. Die Inkorporation dieses Modus der Interaktion (zusammen mit der Annahme, dass die Bindung zwischen den Dimeren von Gal4 und Gal80 kooperativ erfolgt) in das mathematische Modell führt zu einem Schaltmechanismus, der trotz der relativ niedrigen Affinität zwischen Gal1 und Gal80 sehr effizient operieren kann (s. Abschnitt 3.7.4). Dieser Modus der Interaktion zwischen Gal1 und Gal80 ermöglicht es, dass nunmehr zwei schwache Interaktionen gegen eine sehr starke Bindung kompetieren, was letztlich zu einer effektiven Konkurrenz trotz schwacher apparenter Affinität führt. Nach dieser Modellvorstellung ist eine starke Dimerisierung von Gal80 nicht nur für die starke kooperative Bindung an Gal4 erforderlich, sondern bietet zudem die Möglichkeit für eine effiziente Konkurrenz gegen diese Bindung durch Gal1.

Zusammengenommen favorisieren die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse ein Modell, nach welchem *K/Gal1* an das *K/Gal80*-Dimer binden kann (und nicht gegen dieses kompetiert). Prinzipiell ist es möglich (wenn auch unwahrscheinlich), dass der Modus der Interaktion zwischen *ScGal80* und *ScGal3* (bzw. *ScGal1*) sich von dem der Regulatoren aus *K. lactis* (wie er hier postuliert wird) unterscheidet. Es gibt eine sehr interessante Möglichkeit, die beiden vorgeschlagenen Interaktionsmodi (Konkurrenz gegen Gal80 Dimerisierung oder Bindung an Gal80 Dimer) experimentell zu unterscheiden. Dies könnte z.B. auf der Basis von *in-vitro*-Transkriptionsexperimenten geschehen, wie sie von Platt und Reece (1998) vorgestellt wurden. In diesen Experimenten wurde ein ca. 30-facher molarer Überschuss von *ScGal3* gegenüber *ScGal80* benötigt, um den inhibitorischen Effekt von *ScGal80* auf *ScGal4* aufzuheben. Wie in Abschnitt 3.7.5 gezeigt wurde, bedingt der in dieser Arbeit postulierte Interaktionsmodus zwischen den Regulatoren, dass eine gleichzeitige Erhöhung der Konzentrationen von Gal80 und Gal1 (bzw. Gal3) zu einer stärkeren Aktivierung von Gal4 führt. Sofern dieser Modus den Interaktionen der Regulatoren zu Grunde liegt, sollte eine Erhöhung der Gal80-Konzentration in den *in-vitro*-Transkriptionsexperimenten dazu führen, dass dann ein

geringerer molarer Überschuss von Gal1/Gal3 gegenüber Gal80 benötigt wird, um eine Aktivierung von Gal4 herbeizuführen. Ein Interaktionsmodus, in welchem Gal1/Gal3 gegen die Gal80-Dimerisierung kompetiert, würde ein solches Ergebnis nicht erwarten lassen (Simulationen nicht gezeigt).

Wie lässt sich nun erklären, dass der Interaktionsmodus zwischen den Regulatoren (welcher in dieser Arbeit in dem komplexeren mathematischen Modell angenommen wurde) das eher kontra-intuitiven Verhalten bewirkt, dass eine gleichzeitige Erhöhung von Gal1 und Gal80 zu einer stärkeren Aktivierung von Gal4 führt? Die Antwort darauf kann hier nur in Ansätzen gegeben werden. Betrachtet man in dem Modell lediglich die Interaktionen zwischen Gal1 und Gal80 (vernachlässigt man also zunächst Gal4 durch Setzen seiner Konzentration auf Null), so zeigt sich, dass die gleichzeitige Zunahme von Gal1<sub>0</sub> und Gal80<sub>0</sub> (gemeint sind hier die Gesamtkonzentrationen) ab einem Verhältnis von Gal1<sub>0</sub>/Gal80<sub>0</sub> größer als 1 zu einer Abnahme der absoluten (!) Konzentration des freien Gal80-Dimers (Gal80<sub>2</sub>) führt (Simulationen nicht gezeigt). [Hier eine Notiz am Rande: Tatsächlich ist der Verlauf der Konzentration von Gal80<sub>2</sub> in Abhängigkeit von Gal80<sub>0</sub> bzw. gleichzeitig Gal1<sub>0</sub> nicht monoton; der Wendepunkt, ab welchem nach einem Anstieg der Gal80<sub>2</sub>-Konzentration ein Absinken erfolgt, ist abhängig vom Gal1<sub>0</sub>/Gal80<sub>0</sub>-Verhältnis und der Affinität zwischen beiden Proteinen]. Nimmt man nun an, dass das Dimer von Gal80 in Bezug auf die Bindung an Gal4 die aktivste (kooperative Bindung der Dimere) oder einzige (wie vereinfachend im Modell angenommen) Gal80-Spezies ist, dann folgt daraus, dass die effektive Konzentration von Gal80, welches zur Bindung an Gal4 zur Verfügung steht, durch die gleichzeitige Zunahme von Gal1<sub>0</sub> und Gal80<sub>0</sub> reduziert wird (sofern Gal1<sub>0</sub>/Gal80<sub>0</sub> > 1). Dies kann (zumindest in Ansätzen) erklären, dass die gleichzeitige Zunahme von Gal1<sub>0</sub> und Gal80<sub>0</sub> im komplexeren Modell zu einer verstärkten Freisetzung von Gal4 führt.

#### 4.5. Konkurrenz der K/Gal80-Multimerisierung gegen die Bindung von K/Gal1

Ein Befund, welcher in der Diskussion (und auch in den mathematischen Modellen) bislang vernachlässigt wurde, ist die in Abschnitt 3.3.5 gezeigte Konkurrenz von K/Gal80-S2 gegen die K/Gal1-K/Gal80-Interaktion. Die naheliegendste Annahme ist, dass dieser Effekt auf einer Bindung zwischen K/Gal80 und K/Gal80-S2 beruht. Legt man weiter die Annahme zu Grunde, dass die Interaktion zwischen K/Gal80 und K/Gal80-S2 qualitativ einer Interaktion entspricht, welche auch von dem Wildtypprotein eingegangen werden kann (also einer Selbst-Interaktion von K/Gal80), dann können die Daten dahingehend interpretiert werden, dass

eine Selbstinteraktion von *K/Gal80* gegen die Bindung von *K/Gal1* kompetiert, wobei die einfachste Erklärung für dieses Phänomen in der Annahme einer direkten Kompetition besteht. Auf dieser Basis stellt sich nun die Frage, welche Selbstinteraktion von *K/Gal80* gegen die Bindung an *K/Gal1* kompetiert. Wie schon im vorigen Abschnitt diskutiert wurde, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Dimerisierung von *K/Gal80* dafür verantwortlich zeichnet. Die naheliegendste Erklärung ist somit, dass die Formation des Multimers höherer Ordnung (des putativen Tetramers) gegen die Bindung von *K/Gal1* kompetiert.

In Abschnitt 3.3.5 wurde gezeigt, dass die Variante *NHGal80-S2*, welche nicht an *K/Gal1* binden kann, eine stärkere Tendenz zur Multimerisierung besitzt als das Wildtypprotein. Eine interessante Hypothese wäre, dass die Unfähigkeit zur Bindung an *K/Gal1* eine Folge der stärkeren Multimerisierung und damit einhergehend einer stärkeren Kompetition gegen die Bindung von *K/Gal1* ist. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da *NHGal80-S2* im Galaktokinase-Inhibierungsexperiment auch bei Anwesenheit von 30 mM EDTA keinerlei inhibitorische Aktivität zeigte (Daten nicht gezeigt); die in Abbildung 13 gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass *NHGal80-S2* unter diesen Bedingungen zumindest teilweise in dimerer Form vorliegt und bei Zutreffen der Hypothese somit zumindest eine schwache Bindung an *K/Gal1* zeigen sollte. Die Unfähigkeit von *NHGal80-S2* zur Bindung an *K/Gal1* scheint also nicht die Folge seines veränderten Multimerisierungsverhaltens zu sein. Die Koinzidenz dieser beiden veränderten Eigenschaften von *NHGal80-S2* könnte vielmehr darauf hindeuten, dass Determinanten für die *K/Gal1*-Bindung und die Multimerisierung auf *K/Gal80* überlappen.

Eine gegen die Bindung an *K/Gal1* konkurrierende Multimerisierung von *K/Gal80* könnte möglicherweise eine Erklärung dafür bieten, dass die N-terminal 6xHis-markierte Variante *NHGal80* eine geringere Affinität zu *K/Gal1* hat als die Variante *IHGal80* (s. dazu Abschnitt 3.2.2). Wie in Abschnitt 3.3.5 dargelegt wurde, stellt die Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* möglicherweise ein strukturhomologes Protein zu *K/Gal80* dar und der N-Terminus der GFOR ist in die Tetramerisierung dieses Proteins involviert (Kingston *et al.*, 1996; Lott *et al.*, 2000). Ein attraktives Modell wäre demnach, dass die Veränderung des N-Terminus in *NHGal80* zu einer stärkeren Multimerisierung dieses Proteins und damit zu einer schwächeren Bindung an *K/Gal1* führt. Allerdings konnten auch für diese Hypothese während der Arbeit keine Belege erbracht werden. Die Variante *NHGal80* zeigte im Galaktokinase-Inhibierungsexperiment auch in Anwesenheit von 30 mM EDTA (was theoretisch die Formation des putativen Tetramers verhindern sollte) eine geringere Affinität zu *K/Gal1* als die Variante *IHGal80* (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist demnach der N-Terminus von *K/Gal80* direkter in die Interaktion mit *K/Gal1* involviert, obwohl bisherige Mutationsanalysen in *S. cerevisiae* keinen Hinweis darauf geben, dass der N-terminale Bereich von *ScGal80* an der Interaktion mit *ScGal3* beteiligt sein könnte.

Eine sehr einfache Erklärung für die Beobachtungen, dass sowohl die Aktivierungsdomäne von Gal4 als auch (sehr wahrscheinlich) die Multimerisierung von *K/Gal80* gegen die *K/Gal1-K/Gal80*-Interaktion kompetieren, besteht in der Annahme, dass auf *K/Gal80* Bindestellen für *K/Gal1*, Gal4-AD und *K/Gal80* überlappen. Dies würde bedeuten, dass die Multimerisierung von *K/Gal80*, welche gegen die *K/Gal1*-Bindung kompetiert, ebenso gegen die Bindung der Gal4-AD kompetiert. In Bezug auf die in Abschnitt 4.3 geführte Diskussion zur Exponierung eines hydrophoben Epitopes auf *K/Gal80* könnte das bedeuten, dass dieses putative Epitop die Bindestelle für die hydrophobe Aktivierungsdomäne von Gal4 darstellt.

Durch Annahme eines hydrophoben Epitopes auf Gal80, welches durch die Gal4-AD gebunden wird, könnten die von Han und Kodadek (2000) vorgestellten Ergebnisse interpretiert werden. In dieser Arbeit waren Peptide selektiert worden, welche zur Bindung an ScGal80 befähigt waren, wobei sich zeigte, dass diese Peptide gleichzeitig potente Aktivierungsdomänen darstellen. Möglicherweise beruht eine Gemeinsamkeit zwischen diesen beiden Fähigkeiten auf der Tatsache, dass in beiden Fällen hydrophobe Interaktionen eingegangen werden müssen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde gezeigt, dass die Bindung zwischen sauren Aktivierungsdomänen (von Gal4 und VP16) und potentiellen Zielproteinen in der Transkriptionsmaschinerie primär auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht, was unter anderem daraus geschlossen wurde, dass die Stärke der Interaktionen weitestgehend unabhängig von der Ionenstärke des Bindepuffers ist (Ferreira *et al.*, 2005). Es könnte sein, dass die Interaktion zwischen Gal80 und der Gal4-AD, zumindest teilweise, ebenso auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht.

#### 4.6. Annahmen in den Simulationen

Besonderes Augenmerk ist in dieser Arbeit auf die Analyse der Interaktion zwischen *K/Gal80* und *K/Gal1* gelegt worden. Ein Punkt, welcher in Hinsicht der Simulationen mit den mathematischen Modellen möglicherweise als kritisch eingestuft werden könnte, betrifft die Interaktion zwischen *K/Gal80* und *K/Gal4*, welche hier nicht direkt analysiert wurde. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht gelungen ist, funktionales *K/Gal4* oder Minivarianten dieses Proteins zu reinigen. Aus diesem Grund wurde die Bindungsstärke zwischen *K/Gal80* und *K/Gal4* indirekt aus der Affinität zwischen *K/Gal80* und miniScGal4 abgeleitet. Aufgrund der sehr starken Konservierung der Gal80-Proteine aus *K. lactis* und *S. cerevisiae* und der Gal80-Bindestellen auf den Gal4-Proteinen beider Hefen (s. dazu auch Abschnitt 3.2.4) scheint dieser Ansatz gerechtfertigt zu sein. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die Affinität zwischen *K/Gal80* und *K/Gal4* niedriger ist als jene, welche zwischen *K/Gal80* und miniScGal4 in dieser Arbeit ermit-

telt wurde. Wahrscheinlicher ist die Annahme, dass die Affinität zwischen beiden Proteinen (speziell *in vivo*) höher ist, insbesondere unter Hinzuziehung der Tatsache, dass deren Interaktion *in vivo* vorrangig an der DNA (mit DNA-gebundenem *K/Gal4*) erfolgt. Die Ergebnisse von Melcher und Xu (2001) legen nahe, dass die Interaktion zwischen *ScGal4* und *ScGal80* durch die Bindung von *ScGal4* an die DNA kooperativ verstärkt wird. Eine höhere Gal4-Gal80-Affinität als jene, welche in den Simulationen in dieser Arbeit angenommen wurde, würde im komplexeren Modell zu einer Steigerung der Schalter-Effizienz führen (s. Abschnitte 3.7.4 und 3.7.6).

Ein weiterer möglicherweise problematischer Punkt betrifft die in den Simulationen getroffene Annahme, dass Gal1 im induzierten Zustand vollständig mit Galaktose abgesättigt ist, was sicherlich *in vivo* nicht der Fall ist (man beachte z.B., dass der  $K_m$ -Wert von *K/Gal1* für Galaktose relativ hoch ist; s. Abschnitt 4.1). Für die Betrachtung der Schalter-Effizienz jedoch scheint diese Annahme nicht kritisch zu sein; die Variation der Parameter im komplexeren Modell zeigt, insbesondere bei Berücksichtigung der Kopplungen (Abschnitt 3.7.6), dass Veränderungen der Gal1-Gal80-Affinität bzw. der Gal1-Gesamtkonzentration (durch Veränderungen dieser beiden Parameter kann eine unvollständige Sättigung mit Galaktose simuliert werden) einen relativ geringen Einfluss auf die Schalter-Effizienz haben. Zudem sollte hier beachtet werden, dass *K/Gal1* im Galaktose-gebundenen Zustand durch *K/Gal80* gebunden (und in seiner enzymatischen Aktivität inhibiert) werden kann; diese Bindung führt somit zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten Galaktose-gebundenen *K/Gal1*-Proteins (da *K/Gal1*-Galaktose durch Bindung an *K/Gal80* dem Gleichgewicht entzogen wird).

Ein Ziel der mathematischen Modellierung und der Simulationen war es zu klären, ob die aus den Experimenten abgeleiteten Modellvorstellungen unter den abgeschätzten quantitativen Rahmenbedingungen prinzipiell eine effiziente Operation des Galaktose-Schalters erlauben. Insofern können die vorgestellten Modelle als Fallstudien betrachtet werden, wobei gezeigt werden konnte, dass ein Schalter auf der Basis des komplexeren mathematischen Modells unter den vorgegebenen Rahmenbedingungen grundsätzlich zur effizienten Operation befähigt ist. Es ist höchst wahrscheinlich, dass *in vivo* eine Reihe weiterer Faktoren die Effizienz des Galaktose-Schalters selbst (z.B. Phosphorylierungen von *K/Gal80* oder *ScGal4*; s. dazu Einleitung) und der Induktionsstärke der *GAL*-Gene (z.B. nicht-lineare Effekte wie Chromatin-Modifikationen) beeinflussen. Das in dieser Arbeit postulierte (und im komplexeren mathematischen Modell integrierte) Interaktionsmodell der Regulatoren scheint jedoch eine gute Basis für die Beschreibung des Galaktose-Schalters und der Galaktose-Induktion zu bilden.

#### 4.7. Überlegungen zur Logik des Galaktose-Schalters oder: Warum wird *GAL80* autoreguliert?

Eine Tatsache, welche auf den ersten Blick widersinnig erscheint, ist die starke Konzentrationszunahme des Inhibitors *KIGal80* während der Galaktose-Induktion, also die Kopplung von *KIGAL80* an den Galaktose-Schalter (Zenke *et al.*, 1993). Durch Kopplung des negativen Regulators an den Schalter wird eine negative Rückkopplung auf den Schaltvorgang erzeugt. Dies scheint umso verwunderlicher, als die Verhinderung der Autoinduktion von *KIGAL80* keinen signifikanten Einfluss auf die basale Expression (unter nicht induzierenden Bedingungen) dieses Gens hat (Zenke *et al.*, 1993). Die Notwendigkeit der negativen Rückkopplung wird plausibel unter Hinzuziehung der Tatsache, dass in dem System eine positive Rückkopplung existiert, welche durch die Kopplung der Induktion des positiven Regulators *KIGAL1* an den Schalter etabliert ist (tatsächlich gibt es sogar eine Reihe positiver Rückkopplungen; s. dazu z.B. Breunig, 2000). Geht man davon aus, dass *KIGal1* und *KIGal80* auch in Abwesenheit von Galaktose miteinander interagieren können (s. dazu Abschnitt 3.7.6), dann bedeutet das, dass die positive Rückkopplung auch unter nicht induzierenden Bedingungen besteht. Ein Fehlen der negativen Rückkopplung kann unter diesen Voraussetzungen dazu führen, dass der nicht-induzierte Zustand nicht mehr hinreichend stabilisiert ist, dass also kleine Schwankungen in den Konzentrationen der Regulatoren ein Umschalten vom nicht-induzierten in den induzierten Zustand auch in Abwesenheit von Galaktose bewirken können. Diese Sichtweise wird durch die Ergebnisse von Versuchen gestützt, in denen die Kopplung von *KIGAL80* an den Galaktose-Schalter (also die Autoregulation) aufgehoben worden war. Die Deletion der Gal4-Bindestellen im *KIGAL80*-Promotor führt in *K. lactis* bei kontinuierlichem Wachstum in nicht induzierendem Medium (Glyzerin) zu einer Induktion des *GAL*-Regulons (Zenke, 1995). Diese Induktion erfolgt ungeachtet der Tatsache, dass die Verhinderung der Autoinduktion keinen negativen Einfluss auf die basale Expression (unter nicht induzierenden Bedingungen) von *KIGAL80* hat (Zenke *et al.*, 1993). Die Verhinderung der Autoregulation von *KIGAL80* führt demzufolge nicht zu einer Verringerung der (über die Population gemittelten) Konzentration des *KIGal80*-Proteins unter nicht induzierenden Bedingungen; der Wegfall der negativen Rückkopplung bewirkt jedoch offenbar, dass der positiven Rückkopplung (Induktion von *KIGAL1*) nicht mehr entgegengewirkt werden kann, was dazu führt, dass eine einmal (z.B. durch Konzentrationsschwankungen) initiierte Induktion nicht mehr aufgehalten werden kann. Bei Zutreffen dieser Annahme sollte die Deletion von *KL GAL1* (bzw. die Verhinderung der *KIGAL1*-Autoregulation) in dem Stamm mit verhaltener *KIGAL80*-Autoregulation zu einer Stabilisierung des nicht-induzierten Zustandes führen. Nach der hier dargelegten Sichtweise ist die Etablierung einer negativen neben der positiven Rückkopplung unter anderem für die Stabilisierung des nicht-induzierten Zustandes notwen-

dig. Dies kann erklären, dass *KIGAL80* an den Schalter gekoppelt und damit auch zwangsläufig während des Induktionsvorganges induziert werden muss. Im Fall von *K. lactis* muss der positive Regulator *KIGal1* auf Grund seiner enzymatischen Funktion, welche zur Verwertung von Galaktose unabdingbar ist, im induzierten Zustand in hohen Konzentrationen vorliegen. Demzufolge muss *KIGAL1* stark induziert werden, was erklären könnte, dass auch *KIGAL80* derart stark induziert werden muss: die starke positive Rückkopplung könnte die Notwendigkeit einer starken negativen Rückkopplung zur Folge haben. In *K. lactis* kommt außerdem hinzu, dass auch *KIGAL4* autoreguliert wird, also eine zweite positive Rückkopplung existiert. Die in Abschnitt 3.8 vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine leichte Erhöhung der Konzentration von *KIGal4* in Kombination mit einem Verlust der *KIGAL4*-Autoregulation zu einer Induktion des *GAL*-Regulons in Abwesenheit von Galaktose führt. Dies deutet darauf hin, dass zur Stabilisierung des nicht-induzierten Zustandes auch der positiven Rückkopplung von *KIGAL4* effizient entgegengewirkt werden muss. Die starke Induktion von *KIGAL80* ist nach den hier geäußerten Vorstellungen also eine notwendige Konsequenz der starken positiven Rückkopplungen auf den Schaltvorgang in *K. lactis*.

In *S. cerevisiae* ist die Aufgabe des positiven Regulators weitestgehend von dem nicht enzymatischen Protein Gal3 übernommen worden. *ScGAL3* und *ScGAL1* sind offensichtlich aus einer Duplikation von *KIGAL1* hervorgegangen (Wolfe und Shields, 1997). Dies ermöglichte eine Trennung der metabolischen und regulatorischen Aktivität von *KIGal1* auf zwei verschiedene Proteine in *S. cerevisiae*. Eine Konsequenz dieser Trennung ist, dass die Konzentration des Regulators *ScGal3* während der Galaktose-Induktion nicht mehr derart stark zunehmen muss wie die des bifunktionellen Proteins *KIGal1* in *K. lactis*. Dies könnte der Grund dafür sein, dass der negative Regulator *ScGAL80* in *S. cerevisiae* wesentlich schwächer induziert wird als *KIGAL80* in *K. lactis* (die Induktion von *ScGAL80* erfolgt auf mRNA-Ebene nur um einen Faktor von ca. 5; Shimada und Fukasawa, 1985).

Nach den obigen Ausführungen ist es (unter anderem zur Stabilisierung des nicht-induzierten Zustandes) unerlässlich, *KIGAL80* an den Galaktose-Schalter zu koppeln. Auf die Effizienz des Schalters hat diese Tatsache jedoch negative Auswirkungen (s. dazu Abschnitte 3.7.5 und 3.7.6). Unter dieser zunächst ungünstigen Voraussetzung gibt es jedoch verschiedene Möglichkeiten, die Schalter-Effizienz zu erhöhen. Eine dieser Möglichkeiten wurde in Abschnitt 3.7.5 vorgestellt. Hier wurde gezeigt, dass die Zunahme der Konzentrationen von Gal1 und Gal80 in gleichem Maße (also bei Annahme einer Kopplung beider Proteine an den gleichen Schalter) auf der Basis des komplexeren mathematischen Modells zu einer stärkeren Aktivierung von Gal4 führt. Allein die Erhöhung der Konzentrationen der beiden Regulatoren Gal1 und Gal80 im Zuge der Galaktose-Induktion hat auf der Basis dieses Modells somit einen positiven Effekt auf die Aktivität des Galaktose-Schalters und damit auf die Schalter-Effizienz.

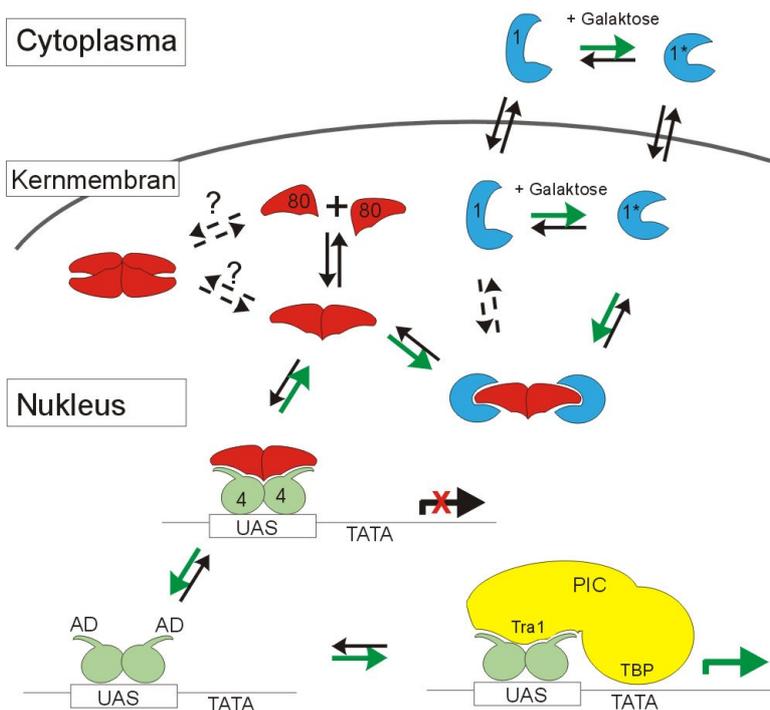
Nichtsdestotrotz würde eine Erhöhung des Konzentrationsverhältnisses zwischen *KIGal1* und *KIGal80* während der Induktion (also eine partielle Entkopplung) eine weitere Steigerung der Schalter-Effizienz bewirken. Erreicht werden könnte dies z.B. dadurch, dass sich während der Induktion das Verhältnis der Expressionsraten von *KIGal1* und *KIGal80* verschiebt, was wiederum durch unterschiedliche Affinitäten der entsprechenden Promotoren zu *KIGal4* bewirkt werden könnte (der *KIGAL80*-Promotor müsste eine höhere Affinität haben als der *KIGAL1*-Promotor und schon bei geringeren *KIGal4*-Konzentrationen mit diesem Protein abgesättigt sein). In diesem Fall könnte die in *K. lactis* erfolgende (leichte) Erhöhung der *KIGal4*-Konzentration während der Galaktose-Induktion dazu führen, dass die Transkriptionsraten von *KIGAL1* und *KIGAL80* in unterschiedlichem Ausmaß zunehmen (Expression von *KIGAL1* würde stärker zunehmen als die von *KIGAL80*), was einer partiellen Entkopplung der beiden Regulatoren entspräche. Die Annahme, dass ein solcher Mechanismus zur partiellen Entkopplung der Regulatoren in *K. lactis* wirkt, ist konsistent mit der Tatsache, dass unter induzierenden Bedingungen eine leichte Überexpression von *KIGal4* im Stamm JA6/2-2 (Zachariae und Breunig, 1993) im Vergleich zum Wildtypstamm zu einer nur 30%igen Steigerung der Expression von *KIGAL80* führt (Zenke *et al.*, 1993), aber zu einer 60%igen Steigerung des Levels an *KIGal1* (Zachariae, 1994). Verschiedene Sensitivitäten beider Promotoren in Bezug auf die *KIGal4*-Konzentration in Kombination mit einer schwachen Induktion von *KIGAL4* während der Galaktose-Induktion könnten also (unter anderem) einen Mechanismus zur partiellen Entkopplung der beiden Regulatoren *KIGal1* und *KIGal80* darstellen.

Die hier geäußerten Überlegungen betreffen teilweise dynamische Aspekte der Galaktose-Induktion und sollten sich demzufolge mit Hilfe dynamischer mathematischer Modelle illustrieren lassen. Dies betrifft auch solche interessanten Phänomene der Galaktose-Induktion in *K. lactis* wie die ausgeprägte Sensitivität in Bezug auf quantitative Veränderungen an den Regulatoren des Galaktose-Schalters (s. z.B. Abschnitt 3.2).

#### 4.8. Modellvorstellung zur Galaktose-Induktion in *K. lactis*

Zusammenfassend soll an dieser Stelle ein Modell zu den Interaktionen und Lokalisationen der Regulatoren des Galaktose-Schalters in *K. lactis* vorgestellt werden, in welches die Ergebnisse dieser Arbeit integriert sind (s. Abb. 27). Nach dieser Modellvorstellung ist *KIGal80* ausschließlich im Zellkern lokalisiert und kann in verschiedenen multimeren Formen vorliegen (wobei das Monomer wegen der hohen Affinität der Dimerisierung in geringer Menge

vorliegt). *K/Gal1* hingegen liegt ausschließlich in monomerer Form vor und kann (unabhängig von *K/Gal80*) zwischen Zellkern und Cytoplasma shuttle; der einfachsten Annahme zufolge sind die Konzentrationen von freiem (nicht an *K/Gal80* gebundenem) *K/Gal1* in beiden Kompartimenten ausgeglichen. Die Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* findet im Kern statt, wobei die Bindungen der *K/Gal1*-Monomere an das *K/Gal80*-Dimer unabhängig (also nicht-kooperativ) erfolgen. Die Bindung von Galaktose (und ATP) an *K/Gal1* führt zu einer Steigerung der Affinität dieses Proteins zu *K/Gal80*; im *K/Gal80*-gebundenen Zustand ist *K/Gal1* enzymatisch inaktiv, wodurch die Interaktion zwischen beiden Proteinen stabilisiert wird. *K/Gal4* und *K/Gal80* binden kooperativ in jeweils dimerer Form aneinander, wobei diese Interaktion die Bindung der Aktivierungsdomäne (AD) von *K/Gal4* an *K/Gal80* beinhaltet. Die Bindung von *K/Gal1* an *K/Gal80* führt zur Freisetzung der AD, indem *K/Gal1* das Epitop auf *K/Gal80* maskiert, welches die AD binden kann. Möglicherweise können *K/Gal4* und *K/Gal80* auf eine alternative Art miteinander interagieren, wobei diese Interaktion nicht die Bindung der AD beinhaltet und nicht durch *K/Gal1* beeinflusst wird. Die für die Aktivierung der *GAL*-Gene relevante Konsequenz der *K/Gal1*-*K/Gal80*-Interaktion ist die Freisetzung der AD von *K/Gal4*. Die freigesetzte AD kann Faktoren der Transkriptionsmaschinerie rekrutieren und so die Assemblierung eines Präinitiationskomplexes am Promotor unterstützen. Die Tetramerisierung von *K/Gal80* könnte sowohl gegen die Bindung an *K/Gal1* als auch gegen die Bindung an die *K/Gal4*-AD kompetieren.



**Abbildung 27.** Modellvorstellung zu den Interaktionen und Kompartimentierungen der Regulatoren des Galaktose-Schalters in *K. lactis*. *K/Gal1* (blau) gelangt unabhängig von *K/Gal80* in den Zellkern und kompetiert dort direkt mit *K/Gal4* (grün) um die Bindung an *K/Gal80* (rot). Die mit grünen Pfeilen symbolisierten Reaktionen sind in Anwesenheit von Galaktose (z.T. indirekt) bevorzugt; die Bindung von Galaktose an *K/Gal1* führt zu einer Form (1\*), welche eine höhere Affinität zu *K/Gal80* besitzt. Die Tetramerisierung von *K/Gal80* könnte gegen die Bindungen an *K/Gal1* und *K/Gal4* kompetieren. Die Freisetzung der Aktivierungsdomäne (AD) von *K/Gal4* führt zur Bindung von Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und damit zur Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIC) am Promotor.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus des Galaktose-Schalters in *K. lactis* untersucht. Zu diesem Zweck wurde die bakterielle Expression und Reinigung der regulatorischen Proteine *K/Gal80* und *K/Gal1* etabliert. Durch Analytische Gelfiltration und Analytische Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass *K/Gal80*, ähnlich wie *ScGal80*, die Fähigkeit zur Multimerisierung besitzt. Eindeutig konnte eine dimere Form von *K/Gal80* nachgewiesen werden; bei einer unter gewissen Bedingungen auftretenden multimeren Form höherer Ordnung handelt es sich wahrscheinlich um ein *K/Gal80*-Tetramer.

Mit Hilfe eines enzymatischen Tests zur Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität von *K/Gal1* konnte gezeigt werden, dass die Bindung zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* mit einer Inhibierung der enzymatischen Aktivität von *K/Gal1* verbunden ist. Auf der Basis dieses Inhibierungsexperimentes konnte die Stärke der Interaktion zwischen *K/Gal1* und verschiedenen *K/Gal80*-Varianten ermittelt werden. Mit Hilfe des Galaktokinase-Inhibierungsexperimentes konnte gezeigt werden, dass *K/Gal1* und die Aktivierungsdomäne (AD) von Gal4 um die Bindung an *K/Gal80* konkurrieren. Die erhaltenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Bindung von *K/Gal1* bzw. der Gal4-AD an *K/Gal80* die Bindung des jeweils anderen Regulators ausschließt. Die einfachste Erklärung für diese Beobachtung besteht in der Annahme einer direkten Kompetition zwischen Gal4-AD und *K/Gal1* um die Bindung an *K/Gal80*. Die ebenfalls auf der Basis der Inhibierungsexperimente erfolgte Quantifizierung der Interaktion zwischen *K/Gal80* und einem Derivat des *ScGal4*-Proteins legt den Schluss nahe, dass die apparente Affinität der *K/Gal80*-*K/Gal4*-Interaktion wesentlich höher ist als die der *K/Gal80*-*K/Gal1*-Interaktion.

Durch Vorarbeiten war bekannt, dass *K/Gal80* (wahrscheinlich ausschließlich) nukleär und *K/Gal1* sowohl nukleär als auch cytoplasmatisch lokalisiert sind. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen *K/Gal1* und *K/Gal80* in *K. lactis* im Zellkern stattfindet. Somit unterscheiden sich die intrazellulären Lokalisationen dieser Regulatoren und das Kompartiment ihrer Interaktion von denen der funktionell homologen Regulatoren *ScGal3* und *ScGal80* in *S. cerevisiae*.

Auf der Basis der experimentellen Daten, welche nahe legen, dass sich die Interaktionen zwischen *K/Gal80* und Gal4-AD einerseits bzw. *K/Gal80* und *K/Gal1* andererseits gegenseitig ausschließen, wurde in dieser Arbeit ein mathematisches Modell zur Beschreibung der Interaktionen zwischen den Regulatoren des Galaktose-Schalters aus *K. lactis* erstellt. Die Simulationen mit diesem Modell erfolgten unter Hinzuziehung der ermittelten Interaktionsstärken und intrazellulären Konzentrationen der Regulatoren (in Kombination mit ihrer Lokalisation).

Es konnte gezeigt werden, dass der Schalter trotz der im Vergleich zur apparenten Affinität zwischen Gal4 und Gal80 relativ niedrigen apparenten Affinität zwischen Gal1 und Gal80 effizient operieren kann. Eine wichtige Voraussetzung für die effiziente Operation des modellierten Galaktose-Schalters ist ein Interaktionsmodus zwischen Gal1 und Gal80, nach welchem Gal1 an die dimere Form von Gal80 binden und die Interaktion der beiden Proteine zur Formation eines heterotetrameren Komplexes führen kann. Die im Verlauf der Arbeit mittels analytischer Ultrazentrifugation gewonnenen Daten legen genau diesen Interaktionsmodus zwischen den beiden Proteinen aus *K. lactis* nahe.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Ahuatzi D, Herrero P, de la Cera T, Moreno F. 2004. The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem.* 279(14):14440-6.

Amuel C. 2003. Untersuchungen zur Funktion und Struktur des Proteins Gal1p der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Anders A. 2000. Ein dynamisches mathematisches Modell der Galaktose-Induktion in der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.

Ansari AZ, Reece RJ, Ptashne M. 1998. A transcriptional activating region with two contrasting modes of protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(23):13543-8.

Barberis A, Petrascheck M. 2003. Transcription activation in eucaryotic cells. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group.

Bhat PJ, Hopper JE. 1992. Overproduction of the GAL1 or GAL3 protein causes galactose-independent activation of the GAL4 protein: evidence for a new model of induction for the yeast GAL/MEL regulon. *Mol Cell Biol.* 12(6):2701-7.

Bhat PJ, Oh D, Hopper JE. 1990. Analysis of the GAL3 signal transduction pathway activating GAL4 protein-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 125(2):281-91.

Bhaumik SR, Green MR. 2001. SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.* 15(15):1935-45.

Bhaumik SR, Raha T, Aiello DP, Green MR. 2004. In vivo target of a transcriptional activator revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Genes Dev.* 8(3):333-43.

Blank TE, Woods MP, Lebo CM, Xin P, Hopper JE. 1997. Novel Gal3 proteins showing altered Gal80p binding cause constitutive transcription of Gal4p-activated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 17(5):2566-75.

- Boles E, Hollenberg CP. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* 21(1):85-111. Review.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Breunig KD. 1989. Related Glucose repression of LAC gene expression in yeast is mediated by the transcriptional activator LAC9. *Mol Gen Genet.* 216(2-3):422-7.
- Breunig KD. 2000. Regulation of Transcription Activation by Gal4p. *Food Technol Biotechnol.* 38(4):287-93.
- Breunig KD. 1989. Multicopy plasmids containing the gene for the transcriptional activator LAC9 are not tolerated by *K. lactis* cells. *Curr Genet.* 15(2):143-8.
- Broach JR. 1979. Galactose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. The enzymes encoded by the GAL7, 10, 1 cluster are co-ordinately controlled and separately translated. *Mol Biol.* 131(1):41-53.
- Brown CE, Howe L, Sousa K, Alley SC, Carrozza MJ, Tan S, Workman JL. 2001. Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science.* 292(5525):2333-7.
- Bryant GO, Ptashne M. 2003. Independent recruitment in vivo by Gal4 of two complexes required for transcription. *Mol Cell.* 11(5):1301-9.
- Cardinali G, Vollenbroich V, Jeon MS, de Graaf AA, Hollenberg CP. 1997. Constitutive expression in gal7 mutants of *Kluyveromyces lactis* is due to internal production of galactose as an inducer of the Gal/Lac regulon. *Mol Cell Biol.* 17(3):1722-30.
- Carey M, Kakidani H, Leatherwood J, Mostashari F, Ptashne M. 1989. An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer. *J Mol Biol.* 209(3):423-32.
- Carey M, Lin YS, Green MR, Ptashne M. 1990. A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives. *Nature.* 345(6273):361-4.
- Carrozza MJ, John S, Sil AK, Hopper JE, Workman JL. 2002. Gal80 confers specificity on HAT complex interactions with activators. *J Biol Chem.* 277(27):24648-52.
- Cavalli G, Thoma F. 1993. Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *EMBO J.* 12(12):4603-13.

- Cheng JX, Floer M, Ononaji P, Bryant G, Ptashne M. 2002. Responses of four yeast genes to changes in the transcriptional machinery are determined by their promoters. *Curr Biol.* 12(21):1828-32.
- Cosma MP, Tanaka T, Nasmyth K. 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell.* 97(3):299-311.
- Dickson RC, Gerardot CJ, Martin AK. 1990. Genetic evidence for similar negative regulatory domains in the yeast transcription activators GAL4 and LAC9. *Nucleic Acids Res.* 18(17):5213-7.
- Ding WV, Johnston SA. 1997. The DNA binding and activation domains of Gal4p are sufficient for conveying its regulatory signals. *Mol Cell Biol.* 17(5):2538-49.
- Engels R. 1999. Die Rolle der Galaktokinase beim Induktionsprozess der *LAC/GAL*-Gene der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Fell DA. 2001. Beyond genomics. *Trends Genet.* 17(12):680-2.
- Ferdous A, Gonzalez F, Sun L, Kodadek T, Johnston SA. 2001. The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell.* 7(5):981-91.
- Ferreira ME, Hermann S, Prochasson P, Workman JL, Berndt KD, Wright AP. 2005. Mechanism of transcription factor recruitment by acidic activators. *J Biol Chem.* 280(23):21779-84.
- Fischer JA, Giniger E, Maniatis T, Ptashne M. 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature.* 332(6167):853-6.
- Fishburn J, Mohibullah N, Hahn S. 2005. Function of a eukaryotic transcription activator during the transcription cycle. *Mol Cell.* 18(3):369-78.
- Gaudreau L, Keaveney M, Nevado J, Zaman Z, Bryant GO, Struhl K, Ptashne M. 1999. Transcriptional activation by artificial recruitment in yeast is influenced by promoter architecture and downstream sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(6):2668-73.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.* 425(6959):737-41.

- Gonzalez F, Delahodde A, Kodadek T, Johnston SA. 2002. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science*. 296(5567):548-50.
- Green MR. 2005. Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell*. 18(4):399-402. Review.
- Guarente L. 1988. UASs and enhancers: common mechanism of transcriptional activation in yeast and mammals. *Cell*. 52(3):303-5. Review.
- Hager K. 2003. Analyse der Spezifität der Gal1-Gal80 Proteininteraktion. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle.
- Halvorsen YC, Nandabalan K, Dickson RC. 1990. LAC9 DNA-binding domain coordinates two zinc atoms per monomer and contacts DNA as a dimer. *J Biol Chem*. 265(22):13283-9.
- Han Y, Kodadek T. 2000. Peptides selected to bind the Gal80 repressor are potent transcriptional activation domains in yeast. *J Biol Chem*. 275(20):14979-84.
- Herrera FJ, Triezenberg SJ. 2004. Molecular biology: what ubiquitin can do for transcription. *Curr Biol*. 14(15):R622-4. Review.
- Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK, Bumgarner R, Goodlett DR, Aebersold R, Hood L. 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*. 292(5518):929-34.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*. 5:387-405.
- Jeong CJ, Yang SH, Xie Y, Zhang L, Johnston SA, Kodadek T. 2001. Evidence that Gal11 protein is a target of the Gal4 activation domain in the mediator. *Biochemistry*. 40(31):9421-7.
- Johnston M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 51(4):458-76. Review.
- Johnston SA, Salmeron JM Jr, Dincher SS. 1987. Interaction of positive and negative regulatory proteins in the galactose regulon of yeast. *Cell*. 50(1):143-6.
- Kakidani H, Ptashne M. 1988. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell*. 52(2):161-7.

- Kapp L. 1997. Regulation des Gal4-Inhibitors Gal80 in Hefe. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJ. 2000. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J Mol Biol.* 299(2):499-520.
- Kingston RL, Scopes RK, Baker EN. 1996. The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP. *Structure.* 4(12):1413-28.
- Klose C. 2004. Struktur und Funktionsanalyse des Gal4-Inhibitors Gal80 aus *Kluyveromyces lactis*. Diplomarbeit, Marthin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Kodadek, TJ. 1994. Protein-protein interactions in transcriptional activation. In *Transcription: Mechanisms and regulation*. Conaway RC, Conaway JW, Raven Press.
- Koh SS, Ansari AZ, Ptashne M, Young RA. 1998. An activator target in the RNA polymerase II holoenzyme. *Mol Cell.* 1(6):895-904.
- Krebs JE, Fry CJ, Samuels ML, Peterson CL. 2000. Global role for chromatin remodeling enzymes in mitotic gene expression. *Cell.* 102(5):587-98.
- Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill ME, Allis CD. 1998. Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev.* 12(5):627-39.
- Kurosu T, Peterlin BM. 2004. VP16 and ubiquitin; binding of P-TEFb via its activation domain and ubiquitin facilitates elongation of transcription of target genes. *Curr Biol.* 14(12):1112-6.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.
- Lee TI, Young RA. 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet.* 34:77-137. Review.
- Leuther KK, Johnston SA. 1992. Nondissociation of GAL4 and GAL80 in vivo after galactose induction. *Science.* 256(5061):1333-5.
- Leuther KK, Salmeron JM, Johnston SA. 1993. Genetic evidence that an activation domain of GAL4 does not require acidity and may form a beta sheet. *Cell.* 72(4):575-85.

Lipford JR, Deshaies RJ. 2003. Diverse roles for ubiquitin-dependent proteolysis in transcriptional activation. *Nat Cell Biol.* 5(10):845-50.

Lipford JR, Smith GT, Chi Y, Deshaies RJ. 2005. A putative stimulatory role for activator turnover in gene expression. *Nature.* 438(7064):113-6.

Lott JS, Halbig D, Baker HM, Hardman MJ, Sprenger GA, Baker EN. 2000. Crystal structure of a truncated mutant of glucose-fructose oxidoreductase shows that an N-terminal arm controls tetramer formation. *J Mol Biol.* 304(4):575-84.

Lue NF, Chasman DI, Buchman AR, Kornberg RD. 1987. Interaction of GAL4 and GAL80 gene regulatory proteins in vitro. *Mol Cell Biol.* 7(10):3446-51.

Ma J, Przibilla E, Hu J, Bogorad L, Ptashne M. 1988. Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature.* 334(6183):631-3.

Ma J, Ptashne M. 1987(a). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell.* 48(5):847-53.

Ma J, Ptashne M. 1987(b). The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell.* 50(1):137-42.

Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC. 1992. DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature.* 356(6368):408-14.

Maru Y, Afar DE, Witte ON, Shibuya M. 1996. The dimerization property of glutathione S-transferase partially reactivates Bcr-Abl lacking the oligomerization domain. *J Biol Chem.* 271(26):15353-7.

Melcher K. 2000. The strength of acidic activation domains correlates with their affinity for both transcriptional and non-transcriptional proteins. *J Mol Biol.* 301(5):1097-112.

Melcher K. 2005. Mutational hypersensitivity of a gene regulatory protein: *Saccharomyces cerevisiae* Gal80p. *Genetics.* 171(2):469-76.

Melcher K, Johnston SA. 1995. GAL4 interacts with TATA-binding protein and coactivators. *Mol Cell Biol.* 15(5):2839-48.

Melcher K, Xu HE. 2001. Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO J.* 20(4):841-51.

- Menezes RA, Amuel C, Engels R, Gengenbacher U, Labahn J, Hollenberg CP. 2003. Sites for interaction between Gal80p and Gal1p in *Kluyveromyces lactis*: structural model of galactokinase based on homology to the GHMP protein family. *J Mol Biol.* 333(3):479-92.
- Meyer J, Walker-Jonah A, Hollenberg CP. 1991. Galactokinase encoded by GAL1 is a bifunctional protein required for induction of the GAL genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the gal3 phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 11(11):5454-61.
- Miller J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Molinari E, Gilman M, Natesan S. 1999. Proteasome-mediated degradation of transcriptional activators correlates with activation domain potency in vivo. *EMBO J.* 18(22):6439-47.
- Moreno F, Herrero P. 2002. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 26(1):83-90. Review.
- Muratani M, Kung C, Shokat KM, Tansey WP. 2005. The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell.* 120(6):887-99.
- Muratani M, Tansey WP. 2003. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(3):192-201. Review.
- Nogi Y. 1986. GAL3 gene product is required for maintenance of the induced state of the GAL cluster genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 165(1):101-6.
- Nogi Y, Fukasawa T. 1989. Functional domains of a negative regulatory protein, GAL80, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 9(7):3009-17.
- Nogi Y, Matsumoto K, Toh-e A, Oshima Y. 1977. Interaction of super-repressible and dominant constitutive mutations for the synthesis of galactose pathway enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 152(3):137-44.
- Pan T, Halvorsen YD, Dickson RC, Coleman JE. 1990. The transcription factor LAC9 from *Kluyveromyces lactis*-like GAL4 from *Saccharomyces cerevisiae* forms a Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster. *J Biol Chem.* 265(35):21427-9.
- Parthun MR, Jaehning JA. 1992. A transcriptionally active form of GAL4 is phosphorylated and associated with GAL80. *Mol Cell Biol.* 12(11):4981-7.

Peng G, Hopper JE. 2002. Gene activation by interaction of an inhibitor with a cytoplasmic signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(13):8548-53.

Peng G, Hopper JE. 2000. Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 20(14):5140-8.

Pilauri V, Bewley M, Diep C, Hopper J. 2005. Gal80 dimerization and the yeast *GAL* gene switch. *Genetics*. 169(4):1903-14.

Platt A, Reece RJ. 1998. The yeast galactose genetic switch is mediated by the formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J*. 17(14):4086-91.

Platt A, Ross HC, Hankin S, Reece RJ. 2000. The insertion of two amino acids into a transcriptional inducer converts it into a galactokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(7):3154-9.

Ptashne M, Gann A. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature*. 386(6625):569-77. Review.

Randez-Gil F, Herrero P, Sanz P, Prieto JA, Moreno F. 1998. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 425(3):475-8.

Reece RJ, Ptashne M. 1993. Determinants of binding-site specificity among yeast C6 zinc cluster proteins. *Science*. 261(5123):909-11.

Reeves WM, Hahn S. 2005. Targets of the Gal4 transcription activator in functional transcription complexes. *Mol Cell Biol*. 25(20):9092-102.

Riley MI, Hopper JE, Johnston SA, Dickson RC. 1987. GAL4 of *Saccharomyces cerevisiae* activates the lactose-galactose regulon of *Kluyveromyces lactis* and creates a new phenotype: glucose repression of the regulon. *Mol Cell Biol*. 7(2):780-6.

Sadowski I, Niedbala D, Wood K, Ptashne M. 1991. GAL4 is phosphorylated as a consequence of transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(23):10510-4.

Salghetti SE, Caudy AA, Chenoweth JG, Tansey WP. 2001. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science*. 293(5535):1651-3.

- Salghetti SE, Muratani M, Wijnen H, Futcher B, Tansey WP. 2000. Functional overlap of sequences that activate transcription and signal ubiquitin-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(7):3118-23.
- Salmeron JM Jr, Johnston SA. 1986. Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene LAC9 reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Nucleic Acids Res*. 14(19):7767-81.
- Salmeron JM Jr, Langdon SD, Johnston SA. 1989. Interaction between transcriptional activator protein LAC9 and negative regulatory protein GAL80. *Mol Cell Biol*. 9(7):2950-6.
- Salmeron JM Jr, Leuther KK, Johnston SA. 1990. GAL4 mutations that separate the transcriptional activation and GAL80-interactive functions of the yeast GAL4 protein. *Genetics*. 125(1):21-7.
- Shimada H, Fukasawa T. 1985. Controlled transcription of the yeast regulatory gene GAL80. *Gene*. 39(1):1-9.
- Sil AK, Alam S, Xin P, Ma L, Morgan M, Lebo CM, Woods MP, Hopper JE. 1999. The Gal3p-Gal80p-Gal4p transcription switch of yeast: Gal3p destabilizes the Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP. *Mol Cell Biol*. 19(11):7828-40.
- Silver PA, Keegan LP, Ptashine M. 1984. Amino terminus of the yeast GAL4 gene product is sufficient for nuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(19):5951-5.
- Struhl K. 1996. Chromatin structure and RNA polymerase II connection: implications for transcription. *Cell*. 84(2):179-82. Review.
- Struhl K. 1989. Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeast. *Annu Rev Biochem*. 58:1051-77. Review.
- Suzuki-Fujimoto T, Fukuma M, Yano KI, Sakurai H, Vonika A, Johnston SA, Fukasawa T. 1996. Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Mol Cell Biol*. 16(5):2504-8.
- Swaffield JC, Bromberg JF, Johnston SA. 1992. Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature*. 357(6380):698-700.
- Timson DJ, Ross HC, Reece RJ. 2002. Gal3p and Gal1p interact with the transcriptional repressor Gal80p to form a complex of 1:1 stoichiometry. *Biochem J*. 363(Pt 3):515-20.

Torchia TE, Hamilton RW, Cano CL, Hopper JE. 1984. Disruption of regulatory gene GAL80 in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on carbon-controlled regulation of the galactose/melibiose pathway genes. *Mol Cell Biol.* 4(8):1521-7.

Torchia TE, Hopper JE. 1986. Genetic and molecular analysis of the GAL3 gene in the expression of the galactose/melibiose regulon of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 113(2):229-46.

Vashee S, Kodadek T. 1995. The activation domain of GAL4 protein mediates cooperative promoter binding with general transcription factors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(23):10683-7.

Verma M, Bhat PJ, Bhartiya S, Venkatesh KV. 2004. A steady-state modeling approach to validate an in vivo mechanism of the GAL regulatory network in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 271(20):4064-74.

Verma M, Bhat PJ, Venkatesh KV. 2003. Quantitative analysis of GAL genetic switch of *Saccharomyces cerevisiae* reveals that nucleocytoplasmic shuttling of Gal80p results in a highly sensitive response to galactose. *J Biol Chem.* 278(49):48764-9.

Vignali M, Steger DJ, Neely KE, Workman JL. 2000. Distribution of acetylated histones resulting from Gal4-VP16 recruitment of SAGA and NuA4 complexes. *EMBO J.* 19(11):2629-40.

Winey M, Yarar D, Giddings TH Jr, Mastronarde DN. 1997. Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol Biol Cell.* 8(11):2119-32.

Wolfe KH, Shields DC. 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* 387(6634):708-13.

Wu Y, Reece RJ, Ptashne M. 1996. Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J.* 15(15):3951-63.

Xu HE, Kodadek T, Johnston SA. 1995. A single GAL4 dimer can maximally activate transcription under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(17):7677-80.

Yankulov K, Blau J, Purton T, Roberts S, Bentley DL. 1994. Transcriptional elongation by RNA polymerase II is stimulated by transactivators. *Cell.* 77(5):749-59.

- Yano K, Fukasawa T. 1997. Galactose-dependent reversible interaction of Gal3p with Gal80p in the induction pathway of Gal4p-activated genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(5):1721-6.
- Yudkovsky N, Ranish JA, Hahn S. 2000. A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator. *Nature*. 408(6809):225-9.
- Yun SJ, Hiraoka Y, Nishizawa M, Takio K, Titani K, Nogi Y, Fukasawa T. 1991. Purification and characterization of the yeast negative regulatory protein GAL80. *J Biol Chem*. 266(2):693-7.
- Zachariae W. 1994. Regulation des Hefetranskriptionsaktivators Lac9. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Zachariae W, Breunig KD. 1993. Expression of the transcriptional activator LAC9 (*KIGAL4*) in *Kluyveromyces lactis* is controlled by autoregulation. *Mol Cell Biol*. 13(5):3058-66.
- Zachariae W, Kuger P, Breunig KD. 1993. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator LAC9 (*KIGAL4*) *Nucleic Acids Res*. 21(1):69-77.
- Zawel L, Kumar KP, Reinberg D. 1995. Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription. *Genes Dev*. 9(12):1479-90.
- Zenke F. 1995. Regulation des Lac9-Inhibitors Gal80 in Hefe. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Zenke FT, Engles R, Vollenbroich V, Meyer J, Hollenberg CP, Breunig KD. 1996. Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science*. 272(5268):1662-5.
- Zenke FT, Kapp L, Breunig KD. 1999. Regulated phosphorylation of the Gal4p inhibitor Gal80p of *Kluyveromyces lactis* revealed by mutational analysis. *Biol Chem*. 380(4):419-30.
- Zenke FT, Zachariae W, Lunkes A, Breunig KD. 1993. Gal80 proteins of *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae* are highly conserved but contribute differently to glucose repression of the galactose regulon. *Mol Cell Biol*. 13(12):7566-76.



## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A <sub>340</sub>	Extinktion bei einer Wellenlänge von 340 nm
ATP	Adenosintriphosphat
AU	beliebige Einheiten
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CoIP	Co-Immunopräzipitation
C-terminal	am Carboxy-Terminus eines Proteins gelegen
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gst	Glutathion S-transferase
GUS	β-Glukuronidase
kb	Kilobasen
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
N-terminal	am Amino-Terminus eines Proteins gelegen
OD	Optische Dichte
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM-Medium	Supplementiertes Minimalmedium
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)



## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), den



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Liebsten, Katja und Sayo, die mein Leben bereichern und mir Rückhalt, Kraft und Liebe zur Bewältigung dieser Arbeit gegeben haben.

Frau Prof. Karin Breunig und Herrn Prof. Ernst Gilles möchte ich für die Ausarbeitung und Überlassung des Themas und Frau Prof. Karin Breunig zudem für die Betreuung der Arbeit und die ständigen und hilfreichen Diskussionen danken.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulargenetik danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft. Vor allem möchte ich mich bei Karin Sorge für ihre Hilfe und das angenehme Laborklima bedanken.

Auch am Institut für Biotechnologie wimmelt es von netten Leuten. Viele Mitarbeiter hier unterstützten mich mit Rat und Tat bei meinen biochemischen Experimenten. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Hauke Lilie, Philine Dobberthien und Thomas Klose bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei den Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Dynamik komplexer technischer Systeme in Magdeburg, speziell bei Dr. Jörg Stelling für seine Hilfe und Unterstützung in Fragen der mathematischen Modellierung. Auch Dr. Andreas Kremling und Martin Ginkel standen mir bei meinen Fragen und Problemen stets hilfreich zur Seite.



## Lebenslauf

Alexander Anders  
Mittelstraße 7  
06108 Halle

Geburt: 07.03.1977 in Moskau

Zivilstand: ledig

1983 - 1991 Polytechnische Oberschule „Ernst Thälmann“, Halle

1991 - 1995 Gymnasium „Albert Schweitzer“, Halle

1995 - 1996 Zivildienst im Senioren- und Pflegeheim „Akazienhof“, Halle

1996 - 2001 Studium der Biologie an der Universität Halle

2001 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität Halle  
Thema: „Ein dynamisches mathematisches Modell der Galaktose-Induktion in der Milchhefe *K. lactis*“

seit 2002 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik der Universität Halle