

**Molekulare Mechanismen von Immunität und
Letalität des viral codierten Killertoxins K1 der
Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Stefanie Gier (M. Sc.)

Saarbrücken

2019

Tag des Kolloquiums

14.02.2020

Dekan

Prof. Dr. Guido Kickelbick

Berichterstatter

Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

Prof. Dr. Martin Simon

Prof. Dr. Raffael Schaffrath

Vorsitzender

Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring

Akademischer Mitarbeiter

Dr. Gilles Gasparoni

Publikationen

Aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen

Gier S., Schmitt MJ., Breinig F. (2017) Expression of K1 Toxin Derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* Mimics Treatment with Exogenous Toxin and Provides a Useful Tool for Elucidating K1 Mechanisms of Action and Immunity. *Toxins*. 9(11):345. doi:10.3390/toxins9110345.

Gier S., Simon M., Nordström K., Khalifa S., Schulz MH., Schmitt MJ., Breinig F. (2019) Transcriptome Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Viral Killer Toxin K1. *Front Microbiol.* 10:1102. doi: 10.3389/fmicb.2019.01102.

Gier S., Lermen M., Schmitt MJ., Breinig F. (2019) Systematic Replacement of Cysteines within the Precursor of Yeast Viral Killer Toxin K1 Reveals Novel Insights in Heterodimer Formation and Immunity. *Sci Rep.* 9(1):13127. doi: 10.1038/s41598-019-49621-z.

Gier S., Simon M., Gasparoni G., Khalifa S., Schulz MH., Schmitt MJ., Breinig F. (2020) Yeast Viral Killer Toxin K1 Induces Specific Host Cell Adaptions via Intrinsic Selection Pressure. *Appl Environ Microbiol.* 86(4). pii: e02446-19. doi: 10.1128/AEM.02446-19.

Gier S., Schmitt MJ., Breinig F. (2020) Analysis of Yeast Killer Toxin K1 Precursor Processing via Site-Directed Mutagenesis: Implications for Toxicity and Immunity. *mSphere.* 5(1). pii: e00979-19. doi: 10.1128/mSphere.00979-19.

Beteiligung an Publikationen

Sadozai SK., Khan SA., Karim N., Becker D., Steinbrück N., Gier S., Breinig F., Kickelbick G., Schneider M. (2020) Ketoconazole Loaded Nanoparticles and its Synergism against *Candida albicans* when Combined with Silver Nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol.* (In Press).

Konferenzteilnahmen

Anteile der Arbeit wurden auf folgenden Konferenzen präsentiert

DGHM 2016 (Ulm): Analysis of the Antimycotic Effect of the Ionophoric Acting Yeast Killer Toxins Zygocin and K1 (**Poster**).

DGHM 2019 (Göttingen): Transcriptome Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in Response to Viral Killer Toxin K1 (**Poster**).

VAAM 2019 (Mainz): Systematic Analysis of Cysteine Residues within the Preprotoxin of Yeast Viral Killer Toxin K1 Reveals Novel Insights in Heterodimer Formation and Immunity (**Vortrag**).

JARVIS, sometimes you gotta run before you can walk.

- Tony Stark

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
ABSTRACT	9
1. EINLEITUNG	10
1.1. Das Killerphänomen der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.2. Genetische Grundlagen des viral codierten Killerphänotyps.....	11
1.3. Killertoxine der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
1.4. Wirkungsmechanismus des K1-Toxins.....	18
1.5. Ausbildung der funktionellen Immunität in K1-Killerhefen.....	20
1.6. Ziele der Arbeit.....	22
2. MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Organismen.....	23
2.1.1. Bakterien.....	23
2.1.2. Hefen.....	23
2.1.3. Deletionsmutanten.....	24
2.2. Kultivierungsbedingungen.....	29
2.2.1. Bakterien.....	29
2.2.2. Hefen.....	29
2.2.3. Kryokultivierung von Bakterien und Hefen.....	30
2.3. Molekularbiologische Methoden.....	30
2.3.1. Plasmide.....	30
2.3.2. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	35
2.3.2.1 Oligonukleotide.....	36
2.3.3. Agarosegelelektrophorese.....	36
2.3.4. Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA.....	37
2.3.5. TOPO TA- <i>Cloning</i>	38
2.3.6. <i>In-Fusion HD-Cloning</i>	39
2.3.7. Transformation von Mikroorganismen.....	39
2.3.7.1. Elektroporation von <i>E. coli</i>	39
2.3.7.2. Lithiumacetat-Transformation von Hefen.....	40
2.3.8. Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i>	41
2.3.8.1. Alkalische Lyse.....	41
2.3.8.2. MiniPrep und MidiPrep.....	42

2.3.9. Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	43
2.3.10. Isolierung doppelsträngiger RNA aus Hefe	43
2.3.11. RT-PCR	45
2.4. Mikrobiologische Methoden	46
2.4.1. Bestimmung der optischen Dichte und des pH-Wertes.....	46
2.4.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl	46
2.4.3. Herstellung von K1-Toxinkonzentraten	46
2.4.3.1. Verwendete Medien.....	46
2.4.3.2. Aufbereitung eines Toxinkonzentrates.....	48
2.4.4. Methylenblau-Agardiffusionstest	48
2.4.4.1. Intakte Hefezellen.....	48
2.4.4.2. Sphäroplasten	50
2.4.5. Serieller Verdünnungstest	51
2.5. Proteinbiochemische Methoden	52
2.5.1. Zellaufschluss mittels Glasperlen.....	52
2.5.2. TCA-Fällung	52
2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	53
2.5.4. Western Blot.....	54
2.5.4.1. <i>Semi-dry</i> Blotting	54
2.5.4.2. Immunodetektion.....	55
2.5.5. Coomassie-Färbung.....	55
2.6. Fluoreszenzmikroskopie.....	56
2.7. Durchflusscytometrie	56
2.8. Metabolitenextraktion	56
2.9. Ionenaustauschchromatographie	57
2.10. Lipidomanalyse	57
2.11. Transkriptomanalyse	58
2.11.1. Vorbereitung und experimentelles Design	58
2.11.2. RNA-Isolierung	58
2.11.3. Illumina-Sequenzierung	59
2.11.4. Auswertung der Daten.....	59
2.11.5. DREM 2.0 Analyse	60
3. ERGEBNISSE	61
3.1. Charakterisierung der K1-Toxinaktivität	61
3.1.1. Toxinaktivität in Abhängigkeit des Kulturmediums	62
3.1.2. Temperatur- und pH-Stabilität des K1-Toxins.....	64

3.1.3. Kationenaustauschchromatographie.....	67
3.1.4. Charakterisierung des K1-Wirkungsspektrums.....	69
3.1.5. Analyse der <i>in vivo</i> Abtötungskinetik des K1-Toxins.....	71
3.2. Effekte von Mutationen der K1-Untereinheiten auf Immunität und Toxizität.....	73
3.2.1. Intrazelluläre Expression von wildtypischen K1-Derivaten.....	74
3.2.2. Substitution der Cysteinreste des K1-Toxins	78
3.2.3. Substitution und Mutation der Präpro-Region	86
3.2.4. Substitution und Mutation der K1- γ -Untereinheit.....	90
3.2.5. Expression von K1-Letalkonstrukten mit C-terminalen Argininresten	95
3.2.6. C-terminales Tagging der K1-Toxinuntereinheiten	97
3.3. Zeitabhängige Transkriptomanalyse K1-sensitiver Zellen nach Toxinapplikation .	100
3.4. Charakterisierung zellulärer Adaptationen in K1-Killerhefen	116
3.4.1. Phänotypische Charakterisierung von KIM01 und KIM01s	117
3.4.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von KIM01 und KIM01s.....	125
4. DISKUSSION.....	132
5. ZUSAMENFASSUNG.....	171
6. LITERATUR.....	173
7. ANHANG.....	188

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäure	PC	Phosphatidylcholin
ATP	Adenosintriphosphat	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
AU	<i>Arbitray Unit</i>	PE	Phosphatidylethanolamin
bp	Basenpaare	PG	Phosphatidylglycerol
BP	<i>Biological Process</i>	PI	Propidiumiodid
CP	<i>Catabolic Process</i>	PIN	Phosphatidylinositol
C-Terminus	Carboxy-Terminus	Pol	Polymerase
CWI	<i>Cell Wall Integrity</i>	pptox	K1-Volllängentoxin
d/o	<i>Drop Out</i>	PS	Phosphatidylserin
DAG	Diacylglycerol	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA	rpm	<i>Revolutions per Minute</i>
EE	Ergosterolester	SDS	Natriumdodecylsulfat
ER	Endoplasmatisches Retikulum	SP	Signalpeptidase-Komplex
F.E.	<i>Fold Enrichment</i>	SS	<i>Leader-Sequenz des K1-Toxins</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	ssRNA	einzelsträngige RNA
GO	<i>Gene Ontology</i>	TAG	Triacylglycerol
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>	TCA	Trichloressigsäure
IMP	Inosinmonophosphat	THF	Tetrahydrofolat
kb	Kilobasen	TF	Transkriptionsfaktor
kDa	Kilodalton	TMT	<i>Transmembrane Transport</i>
MBA	Methylenblau-Agar	tox	Verkürzte K1-Precursorvariante
N-Terminus	Amino-Terminus	UE	Untereinheit
OD	optische Dichte	v/v	<i>Volume per Volume</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	VLP	<i>Virus-like Particle</i>
PA	Phosphatidsäure	w/v	<i>Weight per Volume</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	WT	Wildtyp
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

ABSTRACT

The K1 toxin represents a heterodimeric A/B proteinaceous toxin that is secreted by *Saccharomyces cerevisiae* strains infected with two distinct double-stranded RNA viruses. In a two-staged receptor-mediated process, the ionophoric activity of K1 leads to an uncontrolled proton influx cumulating in the breakdown of the plasma membrane potential. In this study, various derivatives of the K1 precursor were constructed to analyse structural components essential for toxin activity as well as the mediation of functional immunity. Besides a further biochemical characterisation of the toxin, a transcriptome analysis of a sensitive strain after K1 toxin application was conducted revealing the significant up-regulation of various stress-regulating metabolic pathways, thereby, pointing not only to a complex toxic effect but also to a defence mechanism of non-killer yeast at least initially counteracting the ionophoric action. Furthermore, comparative analysis of two K1 killer strains with distinct phenotypical differences showed substantial intrinsic selection pressure in response to the level of toxin secretion. Moreover, the data suggest that immunity of the killer yeast is based on a balanced interplay between the toxin precursor within the secretory pathway and the number of toxin molecules attacking the toxin-producing cell.

Das Killertoxin K1 stellt ein heterodimeres A/B-Toxin dar, welches von Stämmen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* sezerniert wird, die mit zwei spezifischen doppelsträngigen RNA-Viren infiziert sind. Der toxische Effekt des ionophoren K1-Toxins führt zu einem unkontrollierten Protoneninflus, der in einem Zusammenbruch des Plasmamembranpotentials kumuliert. In dieser Arbeit wurde durch Konstruktion unterschiedlicher K1-Derivate der Einfluss struktureller Komponenten auf die toxische Wirkung sowie die Vermittlung der Immunität charakterisiert. Neben einer weiterführenden biochemischen Charakterisierung des Toxins wurde mit Hilfe einer Transkriptomanalyse die zeitabhängige Reaktion eines sensitiven Stammes auf die Applikation des Ionophors analysiert. Hierbei wurde eine deutliche Induktion diverser zellulärer Stressreaktionen dokumentiert, die nicht nur auf einen komplexen Mechanismus des K1-Toxins, sondern auch auf eine initiale Abwehrreaktion sensibler Zellen hindeuten. Weiterhin wurde mit Hilfe von K1-Killerstämmen die Co-Adaptation der Toxin-produzierenden Zellen in Abhängigkeit des Killervirus untersucht. Hierbei konnte die Ausbildung der Immunität als ein titrierbarer Mechanismus beschrieben werden, der einen distinkten intrinsischen Selektionsdruck auf Basis der Menge an sezerniertem Toxin ausübt.

1. EINLEITUNG

Die Sekretion toxisch wirkender Peptide ist ein evolutionär konserviertes Phänomen, das zu signifikanten Wachstumsvorteilen der entsprechenden Organismen bzw. Zellen in einem bestimmten biologischen Habitat beitragen kann. Zu den bekanntesten Toxinproduzenten gehören bakterielle Vertreter wie beispielsweise *Vibrio cholerae* oder *Corynebacterium diphtheriae*, denen vor allem aufgrund der hohen Krankheitsprävalenz in medizinischen und klinischen Bereichen große Bedeutung zukommt. Allerdings ist die Ausprägung eines solchen Phänotyps nicht auf Prokaryonten beschränkt, sondern auch ein besonderes Charakteristikum vieler eukaryontischer Zellen; so konnte die Bildung antimikrobieller Peptide nicht nur in pflanzlichen Zellen, sondern auch in Insekten- und Säugerzellen nachgewiesen werden, in denen sie eine essentielle Schutzfunktion vor bakteriellen und fungalen Infektionen einnehmen (Kagan, 1990; Marcus *et al.*, 1997).

1.1. Das Killerphänomen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Auch Pilze und Hefen sind in der Lage, toxisch-wirkende Proteine bzw. Glycoproteine zu sezernieren, wobei dieses Phänomen erstmals für die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben und genauer charakterisiert wurde (Bevan & Makower, 1963). Hierbei sind entsprechende Killerhefen in der Lage, sensitive Zellen derselben oder einer anderen Hefegattung ohne direkten Zell-Zell-Kontakt abzutöten, wobei dieses so genannte Killerphänomen zwischenzeitlich ebenfalls in einer Vielzahl anderer Hefegattungen wie beispielsweise *Candida*, *Pichia* und *Zygosaccharomyces* nachgewiesen wurde (Yokomori *et al.*, 1988, Hayman & Bolen, 1991; Park *et al.*, 1994; Schmitt *et al.*, 1997). Umfangreiche Untersuchungen der unterschiedlichen Killersysteme konnten nicht nur Hinweise auf den Wirkungsmechanismus der jeweiligen Toxine, sondern auch auf zur Aufklärung relevanter Prozesse der eukaryontischen Zellbiologie wie der Prozessierung von Vorläuferproteinen oder der Virus-Wirtsinteraktion beitragen (Wickner, 1992; Wickner, 1996; Schmitt & Breinig, 2002). Praktische Anwendungsgebiete finden Killerhefen vor allem in der Lebensmittelindustrie, in welcher sie als Starterkulturen für Fermentations- oder Gärungsprozesse verwendet werden und potentielle Kontaminationen mit unerwünschten Fremdhefen während des Herstellungsprozesses verhindern können (Salek *et al.*, 1992; Javadekar *et al.*, 1995). In der Landwirtschaft können Killertoxine zum Schutz von Nutzpflanzen angewendet werden; beispielsweise führte die Expression des Killertoxins von

Ustilago maydis in transgenen Tabakpflanzen zur Bildung eines aktiven Toxins, welches die Pflanzen vor phytopathogenen Hefen schützte (Kinal *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1996). Zudem zeigt der Einsatz von Killertoxinen mit breiten Wirkungsspektren beispielsweise zur Biotypisierung pathogener Hefespezies großes Potential in medizinisch-klinischen Bereichen (Polonelli & Conti, 2009). Killertoxine stellen weiterhin einen vielversprechenden Ansatz zur antifungalen Therapie dar, da wegen der hohen strukturellen Ähnlichkeit von Pilzen und humanen Zellen und der steigenden Prävalenz von resistenten humanpathogenen Hefen eine Behandlung unter Verwendung kommerzieller Antimykotika mit zum Teil schweren Nebenwirkungen verbunden ist (Theisen *et al.*, 2000; Buzzini & Martini, 2001; Selitrennikoff, 2001).

1.2. Genetische Grundlagen des viral codierten Killerphänotyps

Die genetischen Grundlagen zur Ausbildung des Killerphänotyps bei Hefen sind komplex und spielen eine wichtige Rolle bei der Identifizierung und Klassifizierung unterschiedlicher Killersysteme. Während das Killertoxin Zymocin der Hefe *Kluyveromyces lactis* beispielsweise durch lineare doppelsträngige DNA-Plasmide codiert ist, kann die genetische Information zur Ausbildung der Killereigenschaften auch auf chromosomalen Abschnitten der Wirtszelle vorliegen, wie es für Toxine der Gattung *Williopsis* gezeigt werden konnte (Gunge *et al.*, 1981; Jablonowski & Schaffrath, 2007; Hodgson, 1995). Im Fall der Bäckerhefe ist die Sekretion von Killertoxinen auf doppelsträngige RNA-Viren (dsRNA-Viren) der Familie der *Totiviridae* zurückzuführen, welche aufgrund ihrer fehlenden Infektiosität als *Virus-like Particles* (VLP) bezeichnet werden. Zur Ausprägung eines stabilen Killerphänotyps müssen zwei distinkte dsRNA-Mykoviren, LA (*Large*) und M (*Medium*), im Cytoplasma der Hefe persistieren; letztere werden hierbei auch als Satellitenviren bezeichnet. Das ikosahedral aufgebaute Kapsid beider dsRNA-Viren setzt sich aus 120 Kopien des 76 kDa großen Hauptkapsidproteins Gag zusammen, welche in 60 asymmetrischen Dimeren angeordnet sind, so dass aufgrund dieses Aufbaus über die Oberfläche des Viruskapsids verteilt Öffnungen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von ca. 10-15 Angström entstehen (Naitow *et al.*, 2002). Diese erlauben einen Influx von wirtseigenen Metaboliten zur RNA-Synthese bzw. -Replikation sowie den Austritt von transkribierter viraler RNA und sind dabei gleichzeitig klein genug, um das Virusgenom vor Degradation zu schützen (Naitow *et al.*, 2002; Caston *et al.*, 1997).

Das 4,6 kb große Genom der LA-Viren aus *S. cerevisiae* ist aus einem nicht-segmentiertem

dsRNA-Nukleinsäuremolekül aufgebaut, dessen codogener Einzelstrang ((+)ssRNA) sowohl für das Hüllprotein Gag als auch für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (Pol) codiert (Icho & Wickner, 1989). Letztere wird über einen -1 ribosomalen *Frameshift*, welcher mit einer Häufigkeit von 2 % während der Translation eintritt, als Gag-Pol-Fusionsprotein exprimiert, so dass die Kopienanzahl der Polymerase im Verhältnis zu den vorhandenen Kapsidmolekülen bei zwei Fusionsproteinen pro Virion liegt (Dinman & Wickner, 1992; 1994; Fujimura & Wickner, 1992). M-Viren hingegen besitzen ein deutlich kleineres Genom (1,5 kb bis 2,3 kb) mit lediglich einem *Open Reading Frame* (ORF), der für das entsprechende Killertoxin codiert. Die Replikation beider Mykoviren erfolgt konservativ im Cytoplasma der Wirtszelle, wobei der (+)ssRNA-Strang zunächst transkribiert und schließlich aus der Virushülle ausgeschleust wird (Esteban & Wickner, 1986), (**Abb. 1**).

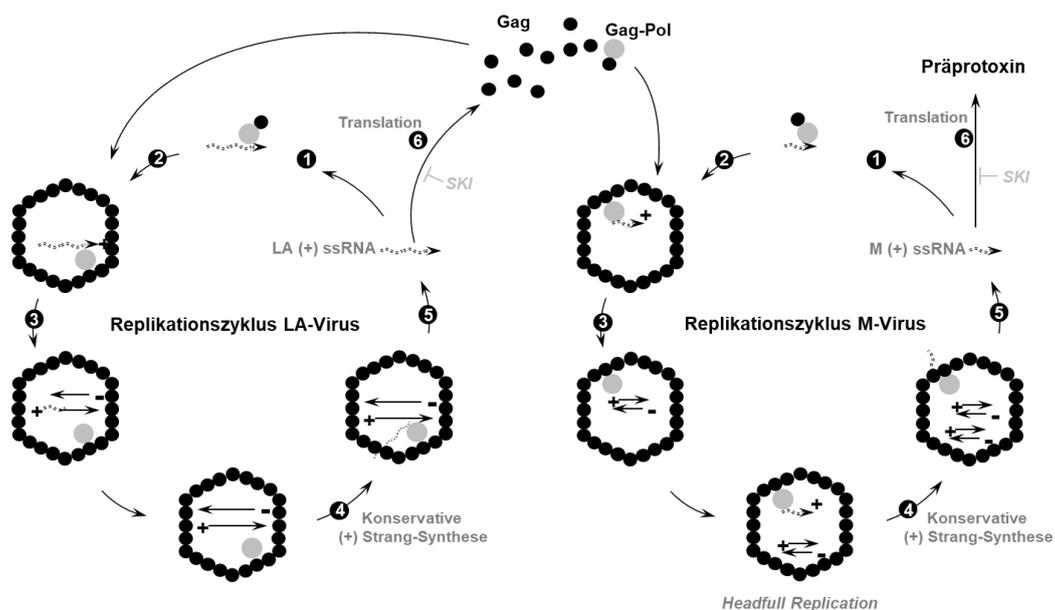


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Replikationszyklus der dsRNA-Mykoviren LA und M im Cytoplasma der Wirtszelle. Die Replikation beginnt mit der Bindung des Gag-Pol-Fusionsproteins an freie einzelsträngige (+)RNA ((+)ssRNA) (1), wodurch die Verpackung des entsprechenden Virusgenoms eingeleitet wird (2). Im Anschluss erfolgt die Replikation des komplementären (-)Stranges durch Gag-Pol (3). Im Unterschied zu LA-Helferviren kann das M-Viruskapsid hierbei aufgrund der geringeren Genomgröße zwei dsRNA-Kopien fassen (*Headfull Replication*) bevor nach konservativer Replikation (4) ein weiterer (+)ss-RNA-Strang aus dem Viruspartikel ausgeschleust wird (5). Im Cytoplasma dient dieser als mRNA-Matrize zur Transkription und Translation der viral codierten Gene (6). Da das M-Virus lediglich für den entsprechenden Killertoxinvorläufer codiert, ist es zur Replikation und Verpackung der ssRNA auf die Genprodukte des LA-Virus angewiesen; dieses codiert für das Viruskapsidprotein (Gag) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase (Gag-Pol-Fusionsprotein). Ein stabiler Killerphänotyp kann aus diesem Grund nur in Anwesenheit beider Viren ausgebildet werden (verändert nach Schmitt & Breinig, 2006).

Neuere Untersuchungen zeigten, dass viralen ssRNA-Molekülen im Cytoplasma der Hefezelle eine 5'-Cap-Struktur - klassischerweise bestehend aus einem 7-Methylguanosin

(m⁷G) - angefügt wird, welche zuvor von wirtseigenen mRNA-Molekülen enzymatisch abgespalten wurde. Dieser Prozess wird als *Cap Snatching* bezeichnet und ist elementar für eine effektive Translation der viralen Transkripte (Fujimura & Esteban, 2019). Hierbei transferiert das LA-Virus die m⁷Gp-Struktur der Wirts-mRNA zu den 5'-diphosphorylierten Enden der eigenen viralen (+)ssRNA-Stränge. Dieser Mechanismus ist einzigartig für das LA-Virus und unterscheidet sich beispielsweise deutlich von der Vorgehensweise des Influenzavirus (Plotch *et al.*, 1981). Durch die Verwendung der bereits vorhandenen Strukturen kann das LA-Virus seine viralen Transkripte nicht nur effektiv in die Translationsmaschinerie der Wirtszelle einschleusen, sondern benötigt auch keine eigenen Mechanismen, um authentische Capping-Strukturen zu generieren. Im Unterschied zu infektiösen Reoviren, die ebenfalls ein dsRNA-Genom besitzen, allerdings für eine eigene Capping-Maschinerie codieren, kann so die Segmentierung des Genoms deutlich einfacher und kompakter gehalten werden (Luongo *et al.*, 2000). Die Translation der Cap-tragenden (+)ssRNA-Stränge erfolgt im Cytoplasma der Wirtshfezelle, wobei zusätzlich virale ssRNA-Moleküle ohne diese 5'-Modifikation von der Polymerase-Domäne des Gag-Pol-Proteins erkannt und für die Verpackung weiterer Viruspartikel genutzt werden. Nach vollständiger Umhüllung durch die Kapsidproteine wird mit Hilfe des (+)ssRNA-Strangs, welcher als Matrize für das nun als Replikase wirkende Gag-Pol-Fusionsprotein dient, der komplementäre (-)Strang synthetisiert. Der Replikationszyklus der M-Satellitenviren ist prinzipiell mit dem der LA-Viren vergleichbar, allerdings kann das Kapsid aufgrund der deutlich geringeren Größe des M-Genoms zwei dsRNA-Kopien aufnehmen bevor Transkripte aus der viralen Hülle ausgeschleust werden. Dieser Mechanismus wird als *Headfull Replication* bezeichnet und kann ähnlich auch bei Bakteriophagen beobachtet werden (Esteban & Wickner, 1986; Fujimura *et al.*, 1990). Da M-Viren selbst weder für Kapsidproteine noch für Gag-Pol-Proteine codieren, sind sie für ihre Verpackung und Replikation auf das Vorhandensein von selbstreplizierenden LA-Viren angewiesen (**Abb. 1**). Aus diesem Grund können Killerphänotypen mit dieser genetischen Grundlage nur stabil ausgeprägt werden, wenn beide Mykoviren im Cytoplasma der entsprechenden Killerhefe persistieren. Hefezellen, die lediglich mit LA-Viren infiziert sind oder aber das Toxin-codierende M-Virus verloren haben, verhalten sich gegenüber Killertoxinen ebenso sensitiv wie dsRNA-freie Hefezellen (Magliani *et al.*, 1997).

Die Ausprägung des Killerphänotyps und die stabile Replikation des Virusgenoms im Cytoplasma sind von unterschiedlichen wirtseigenen Genprodukten abhängig. Gene der MAK-Familie (*Maintenance of Killer*) spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung und

Stabilisierung der VLP, so dass Mutationen dieser Gene zu einem schnellen Verlust vor allem der M-dsRNA führen; lediglich Mutationen der Gene *MAK3*, *MAK10* und *MAK31* führen zudem zu einem Verlust der LA-Viren (Schmitt & Breinig, 2002). *MAK3* codiert hierbei für die katalytische Untereinheit einer N-Acetyltransferase, welche für die N-terminale Acetylierung des Kapsidproteins Gag notwendig ist (Tercero & Wickner, 1992; Tercero *et al.*, 1993). Die Genprodukte von *MAK10* und *MAK31* sind akzessorische Untereinheiten, welche mit Mak3p interagieren und so einen aktiven Komplex bilden (Polevoda & Sherman, 2001). *SKI*-Genprodukte (*Suppressor of Killer*) hingegen, welche essentielle Bestandteile des wirtseigenen antiviralen Abwehrsystems darstellen, regulieren die Kopienanzahl der Mykoviren im Cytoplasma sowie die Translation der viralen RNA negativ (Wickner & Leibowitz, 1979; Toh-e *et al.*, 1978; Tipper & Schmitt, 1991). Viele Gene der *SKI*-Familie codieren für Komponenten des Exosoms, einem Komplex, der für die 3'-5'-Degradation von RNA verantwortlich ist, bzw. für Proteine, die diesen Komplex regulieren. Das Genprodukt von *SKII* (auch *XRNI*) ist eine Exonuklease, die eine essentielle Rolle in der Degradation von mRNA in 5'-3'-Richtung spielt, so dass eine Überexpression zum Verlust des viralen LA-Genoms führt (Larimer *et al.*, 1992; Esteban *et al.*, 2008). Aus diesem Grund werden Killerhefen mit Mutationen in *SKI*-Genen und einem entsprechend erhöhten M-Virusgehalt, welcher in einer gesteigerten Killertoxin-Expression resultiert, als so genannte Superkiller bezeichnet (Toh-e *et al.*, 1978).

Im Unterschied zu strukturell vergleichbaren, lytisch-agierenden Viren konnte *in vivo* bisher kein extrazelluläres Stadium der Mykoviren nachgewiesen werden, so dass sie in ihrer Reproduktion vom vertikalen Gentransfer wie beispielsweise der Zellteilung oder der sexuellen Vermehrung ihrer Wirtszelle abhängig sind (Wickner *et al.*, 1991; Wickner, 1996). Dieser besondere virale Übertragungsmechanismus stellt dabei möglicherweise eine evolutionäre Anpassung an die relativ hohe Teilungsrate von Hefen dar (Schmitt & Schernikau, 1997; Wickner *et al.*, 1995; Wickner, 1989). Die Vererbung des Killerphänotyps erfolgt im Fall der Paarung einer Killerhefe mit einer sensitiven Hefezelle entgegen den Mendel'schen Regeln, wodurch nach meiotischer Teilung der Zygote vier haploide Killerzellen gebildet werden (Wickner, 1996). Aufgrund dieser rein cytoplasmatischen Übertragung sind Mykoviren hinsichtlich ihrer Replikationseffizienz signifikant auf die Teilungsfähigkeit ihrer Wirtszelle angewiesen; so konnte für viele nicht nur eine asymptomatische Infektion festgestellt werden, sondern teilweise auch eine Steigerung der allgemeinen Fitness infizierter Hefen (Ahn & Lee, 2001). Eine natürliche extrazelluläre Infektionsroute der VLP kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen

werden, da isolierte Viruspartikel *in vitro* erfolgreich in wildtypische Hefen eingebracht werden können, welche infolgedessen einen stabilen Killerphänotyp ausbilden (El-Sherbeini & Bostian, 1987).

1.3. Killertoxine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Killertoxine und ihre Produzenten werden auf Basis der individuellen Toxineigenschaften, der Wirkungsspektren, des genetischen Vererbungsmechanismus sowie der fehlenden Kreuzimmunität klassifiziert. Für *S. cerevisiae* konnten bis dato die vier Killertoxine K1, K2, K28 und Klus aufgrund dieser Eigenschaften unterschieden werden, welche zudem weder auf RNA- noch auf Proteinebene eine signifikante Sequenzähnlichkeit aufweisen. Die Killerhefen sind mit entsprechenden M-Viren (M_1 , M_2 , M_{28} und M_{lus}) infiziert, welche sich auf replikativer Ebene ausschließen, so dass eine simultane Infektion mit mehr als einem M-Virus natürlicherweise verhindert wird und nur ein Killertoxin produziert werden kann (Bussey *et al.*, 1988; Schmitt & Tipper, 1992).

Das Translationsprodukt der viralen mRNA stellt ein Vorläufermolekül (Precursor), ein so genanntes Präprotoxin (pptox), mit einer distinkten Domänenstruktur dar. Am N-Terminus des entsprechenden Proteins befindet sich eine hydrophobe *Leader*-Sequenz, die sowohl das Importsignal (Prä-Region) für das Endoplasmatische Retikulum (ER) als auch eine so genannte Pro-Domäne mit bislang unbekannter Funktion umfasst. Auf diese folgen die beiden Haupttoxinuntereinheiten α und β , welche - im Fall von K1 und K28 - durch eine γ -Sequenz separiert sind (**Abb. 2**). K1 und K28 können aufgrund ihres strukturellen Aufbaus zu den klassischen A/B-Toxinen gezählt werden, wobei die α -Untereinheit die aktive, toxisch-wirkende Komponente darstellt, während die β -Untereinheit die Bindung an die Zielzelle vermittelt. Trotz ihres sehr unterschiedlichen Wirkungsmechanismus verläuft die Prozessierung der Vorläuferproteine beider Toxine ähnlich. Das Präprotoxin unterliegt im Verlauf des anterograden Sekretionsweges mehreren post-translationalen Modifikationen und Prozessierungsschritten, die dem Reifungsprozess des α -Faktors der Bäckerhefe entsprechen bzw. analog für die Konversion von Prohormonen in höheren Eukaryonten beschrieben wurden (Dmochowska *et al.*, 1987; Riffer *et al.*, 2002), (**Abb. 2**). Das reife K1-Heterodimer besteht aus einer α -Untereinheit mit 103 Aminosäuren (AS) und einer β -Untereinheit mit 83 AS, welche jeweils ein Molekulargewicht von 9,5 kDa und 9 kDa besitzen (Zhu *et al.*, 1987; Bussey *et al.*, 1990). Der exakte strukturelle Aufbau der Killertoxine K2 und Klus ist derzeit noch unbekannt. Mittels Sequenz- und

Mutationsanalysen wurde für K2 allerdings die Entstehung eines Dimers postuliert, wobei eine Toxinuntereinheit nach vollständiger Prozessierung glycosyliert vorliegt (Dignard *et al.*, 1991). Im Fall von Klus zeigt der Toxinvorläufer eine ähnliche Domänen-Struktur wie K1 und K28 auf, jedoch bedarf die genaue Prozessierung weiterer Untersuchungen (Rodriguez-Cousino *et al.*, 2011).

Während der ER-Import des K28-Toxins post-translational erfolgt, wird für das 35 kDa große K1-Precursormolekül aufgrund der starken Hydrophobizität der Prä-Region ein co-translationaler Transport postuliert (Breinig *et al.*, 2006). Im ER wird zunächst das Importsignal (Prä-Region) durch die Aktivität des Signalpeptidase-Komplexes (SP) entfernt und es kommt zur Ausbildung von mindestens einer Disulfidbrücke, welche die α - und β -Untereinheiten kovalent miteinander verbindet und durch die enzymatische Aktivität der Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p katalysiert wird (Bostian *et al.*, 1984; Zhu *et al.*, 1992), (**Abb. 2**).

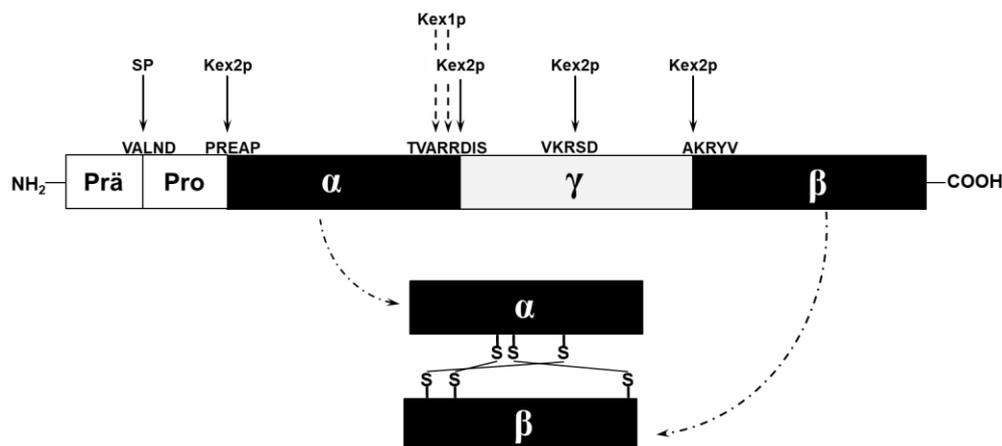


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur und der Prozessierung des K1-Präprotoxins nach aktuellem Stand der Forschung. Am N-Terminus des Killertoxins befindet sich eine hydrophobe Signalsequenz, welche den Import in das Endoplasmatische Retikulum (ER) steuert. Nach Abspaltung dieser durch den ER-ständigen Signalpeptidase-Komplex (SP) erfolgt neben der Glycosylierung der γ -Untereinheit die Ausbildung von Disulfidbrücken, welche die beiden Haupttoxinuntereinheiten, α und β , kovalent verbinden. Im späten Golgi werden die Pro-Region sowie die γ -Untereinheit durch die Endopeptidase Kex2p proteolytisch abgespalten. Zusätzlich werden die beiden Argininreste (RR) am C-Terminus der α -Untereinheit durch die Carboxypeptidase Kex1p entfernt. Das reife K1-Toxin wird im weiteren anterograden Sekretionsweg vesikulär verpackt und in den extrazellulären Raum abgegeben. Die entsprechenden Schnittstellen der einzelnen Proteasen sind mit Hilfe von Pfeilen schematisch verdeutlicht (verändert nach Schmitt & Breinig, 2002).

K28 besitzt lediglich ein Cystein in der α -Untereinheit (C56), so dass folglich nur eine intermolekulare Disulfidbrücke ausgebildet werden kann (C56-C333). Aktuellere Studien konnten zudem die Entstehung einer weiteren intramolekularen Cysteinverbindung

innerhalb der β -Untereinheit nachweisen, während die Thiolgruppe des verbleibenden vierten Cysteinrests ungebunden vorliegt (Breinig *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2017). Im Unterschied hierzu konnten Sequenzanalysen des K1-Toxins in beiden Haupttoxinuntereinheiten jeweils drei Cysteine lokalisieren, die sich an den Positionen C92, C95 und C107 in α sowie C239, C248 und C312 in β befinden. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten wurde die Ausbildung von insgesamt drei Disulfidbrücken mit den Paarungen C92-C248, C95-C312 und C107-C239 postuliert, die allerdings experimentell noch nicht bestätigt werden konnte (Bostian *et al.*, 1984; Schmitt & Tipper, 1995; Zhu *et al.*, 1987).

Im ER erfolgt sowohl für K1 als auch für K28 eine N-Glycosylierung der γ -Untereinheit, welche wahrscheinlich Chaperon-ähnliche Funktionen besitzt und die korrekte Faltung des Toxin-Heterodimers sowie die weitere Prozessierung des Pro-Peptids sicherstellt (Bostian *et al.*, 1984). Für K1 konnten drei Asparaginreste an den Positionen N₁₈₁, N₂₀₃ und N₂₁₆ identifiziert werden, welche aufgrund der typischen Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr potentiell für eine N-Glycosylierung geeignet sind (Bostian *et al.*, 1983; Bussey *et al.*, 1983; Sturley *et al.*, 1986). Die γ -Untereinheit wird ebenso wie die Pro-Region im späten Golgi der Wirtszelle durch die proteolytische Aktivität der Endopeptidase Kex2p entfernt (Zhu *et al.*, 1992). Das K1-Toxin besitzt vier distinkte Kex2p-Schnittstellen, die jeweils C-terminal der Pro-Region (Pro-Arg₄₄), der α -Untereinheit (Arg-Arg₁₄₉) bzw. der γ -Untereinheit (Lys-Arg₂₃₃) sowie innerhalb der γ -Untereinheit (Lys-Arg₁₈₈) lokalisiert sind. Die physiologische Relevanz letzterer konnte bis dato nicht vollständig geklärt werden, das entstehende γ -Fragment könnte allerdings eine wichtige Rolle in der Vermittlung der funktionellen Immunität spielen (Cartwright *et al.*, 1992). Bevor das biologisch aktive Heterodimer mittels sekretorischer Vesikel zur Plasmamembran transportiert und sezerniert wird, erfolgt zudem ein Trimmen von di-basischen Resten an den freien Carboxy-Termini durch die Peptidase Kex1p (Dmochowska *et al.*, 1987; Zhu *et al.*, 1987), (**Abb. 2**). Die Aktivität von Kex1p spielt vor allem für die biologische Aktivität des K28-Toxins eine essentielle Rolle, da durch Abspaltung des C-terminalen Argininrests das zuvor maskierte HDEL-Motiv der β -Untereinheit freigelegt wird, welches für die Bindung an den Sekundärrezeptor und die darauffolgende endocytotische Aufnahme des Toxins notwendig ist. Im Fall des K1-Toxins ist die genaue physiologische Rolle der Kex1p-abhängigen Prozessierung, welche die proteolytische Spaltung von mindestens einem C-terminalen Argininrest der α -Untereinheit umfasst, noch nicht vollständig aufgeklärt (Riffer *et al.*, 2002).

1.4. Wirkungsmechanismus des K1-Toxins

Viral codierte Killertoxine der Bäckerhefe üben ihre toxische Wirkung über einen zwei-stufigen Rezeptor-vermittelten Prozess aus. Ein erster Schritt besteht dabei in einer Energie-unabhängigen, schnellen Bindung der Toxinmoleküle an eine Primärrezeptorfraction auf Ebene der Zellwand, welche mit relativ geringer Affinität und in Abhängigkeit des pH-Wertes erfolgt (Bussey *et al.*, 1979). Nach der Energie-abhängigen Translokation der Toxinmoleküle zur Plasmamembran wird die eigentliche Toxinwirkung durch eine Interaktion mit einem spezifischen Sekundärrezeptor initiiert (Zhu & Bussey, 1989). Das Killertoxin K28 bindet zunächst an die 1,3- α -Mannoproteinfraktion der Zellwand und parasitiert den retrograden Transport der Zielzelle, indem es mit Hilfe des HDEL-Motivs am C-Terminus der β -Untereinheit an den sekundären Rezeptor Erd2p bindet und endocytotisch aufgenommen wird. Im ER der Zielzelle wird das K28-Dimer in das Cytosol transloziert, wo die β -Untereinheit proteasomal degradiert wird und die α -Untereinheit im Nucleus zu einem Block der DNA-Synthese und zu einem Zellzyklusarrest in der G1/S-Phase führt (Heiligenstein *et al.*, 2006; Schmitt *et al.*, 1996).

Das K1-Toxin hingegen wirkt ähnlich wie K2 als Ionophor und tötet sensitive Zellen über eine Disruption der Plasmamembran durch die Bildung von Kationen-selektiven Kanälen (Bussey, 1991). Mutationsanalysen des Präprotoxins konnten distinkte Domänen innerhalb der Toxinuntereinheiten identifizieren, welche essentielle Funktionen für die letale Wirkung besitzen. Die α -Untereinheit besitzt zwei α -helikale hydrophobe Domänen von jeweils 20 bzw. 16 AS, welche von hydrophilen Bereichen umgeben und an der Bildung der Ionenkanäle beteiligt sind. Im Unterschied zu K28 und anderen A/B-Toxinen scheint die α -Untereinheit des K1-Toxins ebenfalls eine Rolle bei der Toxinbindung an die Zellwand zu spielen, die allerdings hauptsächlich von der hydrophilen β -Untereinheit vermittelt wird (Bostian *et al.*, 1984; Bussey, 1991; Zhu & Bussey, 1991). Mit Hilfe eines Screenings K1-resistenter Sphäroplasten wurde das Glycoprotein Kre1p als Sekundärrezeptor des Toxins identifiziert. Dieses Serin/Threonin-reiche Protein ist über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Plasmamembran verankert und hat aufgrund seiner Beteiligung an der Synthese von β -1,6-Glucanen einen signifikanten Einfluss auf den Aufbau und die Komposition der Zellwand (Boone *et al.*, 1990; Breinig *et al.*, 2002; Breinig *et al.*, 2004; Roemer & Bussey, 1995). Eine $\Delta kre1$ -Deletion führt aus diesem Grund zu einer deutlichen Verringerung des β -1,6-Glucangehalts sowie zu einer verkürzten Struktur dieses Polymers, so dass $\Delta kre1$ -Mutanten basierend auf der Reduktion

von Primärrezeptormolekülen eine Toxinresistenz auf Ebene der Zellwand aufweisen. Darüber hinaus sind Hefezellen mit dieser Mutation zusätzlich auf Ebene der Cytoplasmamembran resistent. Auf dieser Basis wurde ein Modell der K1-Wirkung postuliert, welches die Bindung an Kre1p als Sekundärrezeptor auf Stufe der Plasmamembran berücksichtigt (Abb. 3), (Breinig *et al.*, 2002).

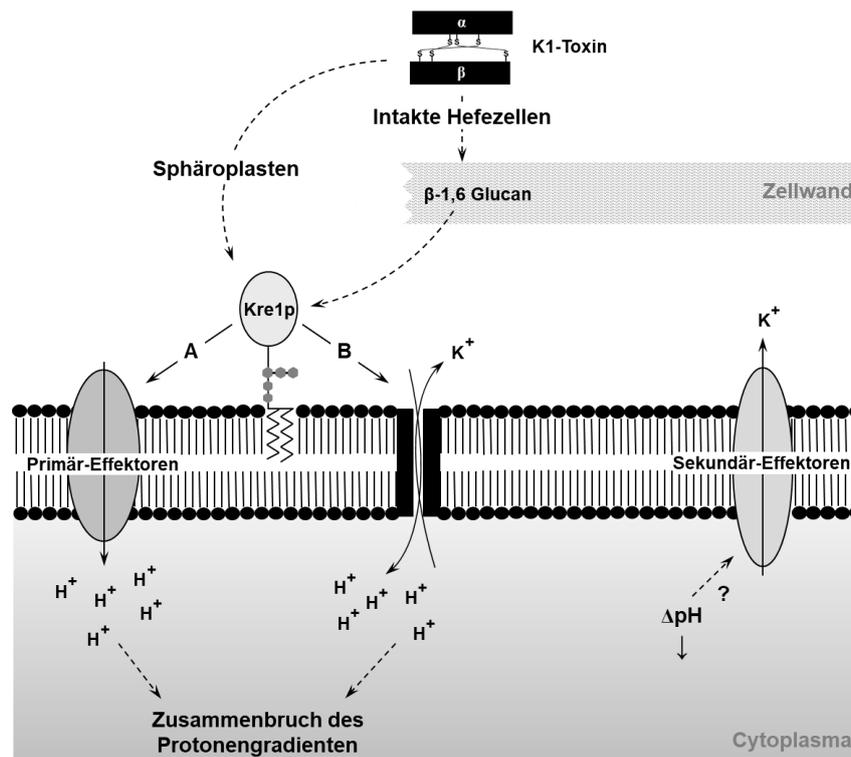


Abbildung 3: Schematische Darstellung des hypothetischen Modells zum Wirkungsmechanismus des Killertoxins K1. Die Wirkung des K1-Killertoxins beruht auf einem Rezeptor-vermittelten zweistufigen Prozess, wobei das reife Toxin-Dimer zunächst Energie-unabhängig an die β -1,6-Glucanfraktion der Zellwand bindet. Im Anschluss erfolgt ein Energie-abhängiger Transport zur Plasmamembran, an welcher eine Interaktion mit dem GPI-verankerten Sekundärrezeptor Kre1p stattfindet; im Fall von zellwandlosen Sphäroplasten kann das Toxin direkt an die Membran gelangen und mit Kre1p interagieren. Im Anschluss erfolgt entweder eine Aktivierung von bzw. Interaktion mit bisher unbekanntem Primäreffektoren (A) oder eine direkte Insertion der α -Untereinheit in die Plasmamembran der Zielzelle (B). In beiden Fällen wird ein unkontrollierter Protoneninflux gekoppelt mit einem Efflux von Kaliumionen induziert, der in einem Zusammenbruch des Transmembrangradienten kumuliert. Durch das Absinken des cytoplasmatischen pH-Wertes könnten zudem sekundäre Effektoren (z. B. Tok1p) aktiviert werden, welche ebenfalls den Efflux von Kaliumionen begünstigen könnten (verändert nach Breinig *et al.*, 2002).

Das Killertoxin K1 bindet zunächst an die β -1,6-Glucanfraktion der Zellwand der Zielzelle (Hutchins & Bussey, 1983); im Fall von sphäroplastierten Zellen, deren Zellwand enzymatisch entfernt wurde, entfällt die Bindung an die Glucanfraktion und K1-Moleküle gelangen direkt an die Plasmamembran der Zielzelle. Trotz intensiver Forschung konnte der exakte Mechanismus der Toxinwirkung des K1-Heterodimers allerdings noch nicht auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Erste Untersuchungen der Toxinwirkung konnten

zeigen, dass eine Oligomerisierung des K1-Toxins von bis zu acht α/β -Dimeren möglich wäre und *in vitro* eine Insertion des Toxins in artifiziellen Liposomen erfolgen kann (Bussey 1991; Bussey *et al.*, 1988; Martinac *et al.*, 1990). Allerdings kann die Beteiligung von weiteren Proteinen nicht ausgeschlossen werden, so dass das derzeitige hypothetische Wirkungsmodell sowohl eine direkte Porenbildung durch das Toxin selbst als auch eine Aktivierung von potentiellen Primäreffektoren berücksichtigt (Breinig *et al.*, 2002), (**Abb. 3**). In sensitiven Hefezellen kann nach Intoxikation mit K1 ein unkontrollierter Protoneninflux beobachtet werden, der mit einem Efflux von Kaliumionen einhergeht, wobei letzterer hierbei wahrscheinlich einen Mechanismus zur Kompensation der erhöhten Protonenanzahl im Cytoplasma der Zelle darstellt (de la Pena *et al.*, 1981). Zusätzlich strömen im Laufe der Zeit vermehrt niedermolekulare Verbindungen, wie Aminosäuren, Glucose und ATP aus der Zelle; in späten Phasen der Toxinwirkung kommt es zusätzlich zur Hemmung der Protein- und Nukleinsäuresynthese (Bussey & Sherman, 1973; de la Pena *et al.*, 1980; Skipper & Bussey, 1977). Weitere Untersuchungen zur Toxizität postulierten den Plasmamembran-ständigen Kaliumkanal Tok1p als ein K1-Targetmolekül (Ahmed *et al.*, 1999). Allerdings zeigte die Verwendung einer $\Delta tok1$ -Nullmutante, dass der Kanal nicht direkt an der letalen Porenbildung, sondern höchstens als sekundärer Effektor an der Toxinwirkung beteiligt ist (Breinig *et al.*, 2002; Bertl *et al.*, 2003).

1.5. Ausbildung der funktionellen Immunität in K1-Killerhefen

Im Unterschied zu bakteriellen Toxinproduzenten, deren Toxine eukaryontische Zielstrukturen angreifen, sind Killerhefen prinzipiell anfällig für das von ihnen sezernierte Toxin, da sie die gleichen Rezeptormoleküle auf der Zellwand und der Plasmamembran exprimieren wie sensitive Hefen. Ihr Überleben ist somit in entscheidender Weise an die Ausbildung eines effektiven Immunitätsmechanismus gekoppelt, der spezifisch für das jeweilige Toxin ist. Aufgrund der molekularen Komplexität der intrinsischen Immunität konnte diese bis dato lediglich für das Killertoxin K28 aufgeklärt werden; hierbei spielt vor allem der post-translationale ER-Import des Präprottoxins eine essentielle Rolle. Durch Endocytose re-internalisierte K28-Moleküle interagieren im Cytoplasma einer Toxinproduzierenden Zelle mit dem unprozessierten Vorläufertoxin, so dass der gebildete Toxin-Precursor-Komplex von der Killerzelle ubiquitiniert und proteasomal abgebaut werden kann (Breinig *et al.*, 2006; Schmitt & Breinig, 2006).

Obwohl gezeigt werden konnte, dass die ionophoren Killertoxine K1 und K2 nicht

unspezifisch in Membranen ihrer Zielzellen inserieren, sind die molekularen Grundlagen, die an der Ausbildung der Immunität beteiligt sind, bis heute unbekannt (Zhu & Bussey, 1989). Ein ursprüngliches Modell, welches auf einem co-translationalen Import des K1-Precursors basierte, postulierte eine Interaktion des K1-Protoxins mit dem ebenfalls im Sekretionsweg prozessierten Kre1p. Die entstehenden Komplexe könnten vakuolär degradiert werden, so dass die Sekundärrezeptorpopulation an der Plasmamembran verringert wird und folglich eine geringere Anzahl extrazellulärer K1-Moleküle die Möglichkeit zur Bindung an K1-Killerhefen haben (Hanes *et al.*, 1986; Tipper & Schmitt, 1991). Untersuchungen an Sphäroplasten konnten allerdings zeigen, dass sowohl immune, d. h. *KRE1*-Nullmutanten, als auch sensitive Zellen eine vergleichbare Menge Toxin binden und die Immunität damit nicht auf einer Kre1p-Blockade beruht, sondern sich vermutlich *downstream* im sekretorischen Weg manifestiert (Breinig *et al.*, 2002). Weiterhin wird eine Beteiligung der N-glycosylierten γ -Untereinheit an der Vermittlung der Immunität vermutet (Boone *et al.*, 1986; Bostian *et al.*, 1984; Breinig *et al.*, 2002). Durch Verwendung von letalen α -Konstrukten, welche C-terminal um die ersten 31 AS der γ -Untereinheit ergänzt wurden, konnte diese Hypothese bekräftigt werden, da die Expression dieser Derivate Immunität gegen extern appliziertes K1 vermitteln konnte (Zhu *et al.*, 1993). Allerdings bleibt bislang ungeklärt, wie γ unter physiologischen Bedingungen mit re-internalisierten K1-Molekülen interagiert und die letale Wirkung unterdrückt.

Aufgrund von *Patch Clamp*-Analysen wurde zudem eine Beteiligung des Kaliumkanals Tok1p an der Ausbildung der Immunität postuliert (Sesti *et al.*, 2001). Diese konnte allerdings ebenso wie die Beteiligung des Kanals am toxischen Effekt durch die Verwendung einer $\Delta tok1$ -Deletionsmutante widerlegt werden, da durch die Expression des K1-Volllängentoxins eine vollständige Immunität in diesen Mutanten ausgebildet werden konnte (Breinig *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die Vermittlung der intrinsischen Immunität des K1-Toxins mit dem Golgi-Vakuolen-*Pathway* der Killerhefe verbunden ist. Im Einklang mit früheren Analysen zur Toxinsensitivität und Immunitätsvermittlung von *vps*-Mutanten, die unterschiedliche Defekte im Vesikeltrafficking aufweisen, könnte dies darauf hindeuten, dass eine korrekte Translokation von vakuolären Proteinen elementar für die Ausbildung der K1-Immunität ist (Douglas *et al.*, 1988; Valis *et al.*, 2006). Allerdings konnte der molekulare Mechanismus des Killertoxins K1 ähnlich wie die Grundlagen der Toxizität bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden.

1.6. Ziele der Arbeit

Obwohl das Killertoxin K1 zu den am besten untersuchten viral codierten Toxinen der Hefe *S. cerevisiae* gehört, konnten trotz jahrzehntelanger Forschung weder der toxische Mechanismus noch die Grundlage der intrinsischen Immunität auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte daher mit Hilfe neuer experimenteller Strategien eine umfassende Analyse der letalen Wirkung auf sensitive Zellen sowie der Schutzmechanismus in Toxin-produzierenden Zellen durchgeführt werden.

Nach der Optimierung der Toxinproduktion mit Hinblick auf eine mögliche Aufreinigung bzw. Kristallisierung sowie der weiteren biochemischen Charakterisierungen des K1-Toxins sollten diverse mutierte Toxinderivate konstruiert und hinsichtlich ihrer Toxizität und der Vermittlung der Immunität untersucht werden. Das Ziel bestand hierbei in der Identifizierung von strukturellen Komponenten, die eine essentielle Rolle im Aufbau und der Prozessierung des Killertoxins spielen. Darüber hinaus sollten die Cysteinreste des Toxins gezielt substituiert werden, so dass mit Hilfe einer Analyse der resultierenden Phänotypen neue Erkenntnisse über die Anzahl sowie die spezifische Paarung der intermolekularen Disulfidbrücken gewonnen werden sollten.

Zur Untersuchung des letalen Effektes sowie der Immunität sollte eine Transkriptomanalyse der K1-sensitiven Hefe *S. cerevisiae* BY4742 durchgeführt werden, um Aufschlüsse über eine globale Regulation des zellulären Transkriptoms nach externer K1-Applikation in Abhängigkeit der Inkubationszeit zu erhalten. In diesem Zusammenhang sollten außerdem unterschiedliche Deletionsmutanten auf ihre K1-Sensitivität untersucht werden, wobei zudem ausgewählte K1-Derivate auch intrazellulär exprimiert wurden. Die beobachteten Phänotypen sollten relevante Einblicke in diverse zelluläre Prozesse gewähren, die essentiell für die Toxizität und die Prozessierung des Killertoxins sind.

Im Hinblick auf die Wirkung von K1 auf die Toxin-produzierenden Zellen selbst, sollte eine vergleichende Analyse des Killerstammes KIM01 und seines Derivats KIM01s, welches eine atypische Sensitivität gegenüber additiv appliziertem K1-Toxin besitzt, neue Hinweise auf potentielle Anpassungen der Wirtszelle geben. Hierzu sollten beide Stämme sowohl auf Proteinebene als auch auf Transkriptom- und Lipidomebene näher charakterisiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Organismen

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Mikroorganismen der Stammsammlung des Lehrstuhles für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen.

2.1.1. Bakterien

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämme sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tabelle 1: Genotyp der verwendeten *E. coli*-Stämme

STAMM	GENOTYP	REFERENZ
TOP10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen
TOP10 F⁺	F ⁺ {lacI ^q Tn10 (Tet ^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen

2.1.2. Hefen

Der Genotyp der in dieser Arbeit verwendeten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme kann **Tabelle 2** entnommen werden.

Tabelle 2: Genotyp der verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme

STAMM	GENOTYP	REFERENZ
BY4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Winston <i>et al.</i> , 1995
BY4742	MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0	Winston <i>et al.</i> , 1995
SEY6210	MATα leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801	Robinson <i>et al.</i> , 1988
192.2d	MATα leu2 ura3	Schmitt <i>et al.</i> , 1996
T158c	MATα his4C-864	Palfree & Bussey, 1979
KIM01	MATα ura3-52 his3 trp1 pho3 pho5, LA(1), M(1), K1-produzierender Killerstamm	El-Sherbeini & Bostian, 1987
KIM01s	MATα ura3-52 his3 trp1 pho3 pho5, LA(1), M(1), Derivat von KIM01	keine Referenz verfügbar

2.1.3. Deletionsmutanten

Die untersuchten Deletionsmutanten wurden von Euroscarf (Deutschland) bezogen und sind in **Tabelle 3** mit zugehörigem Stammhintergrund und Genotyp aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der untersuchten Deletionsmutanten mit zugehörigem Stammhintergrund. Nicht-essentielle Gene wurden in haploiden Hefen (BY4741, BY4742) untersucht (* wurde in beiden Hintergründen untersucht), essentielle Gene wurden in diploiden Hefen (BY4743) bzw. in DAmP-Stämmen (DAmP: *Decreased Abundance by mRNA Perturbation*, markiert mit **) analysiert; Stämme sind alphabetisch nach den Namen des deletierten Gens sortiert.

ORF	GEN	STAMM	GENOTYP
YAR015W	ADE1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YAR015W::kanMX4
YMR120C	ADE17	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YMR120C::kanMX4
YMR300C	ADE4	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YMR300C::kanMX4
YGL234W	ADE5,7	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YGL234W::kanMX4
YJR005W	APL1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YJR005W::kanMX4
YPL195W	APL5*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YPL195W::kanMX4
YGR261C	APL6	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YGR261C::kanMX4
YBR288C	APM3*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBR288C::kanMX4
YLR370C	ARC18	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YLR370C::kanMX4
YDL192W	ARF1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YDL192W::kanMX4
YGL180W	ATG1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YGL180W::kanMX4
YNL242W	ATG2	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YNL242W::kanMX4
YHR171W	ATG7*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YHR171W::kanMX4
YJR121W	ATP2	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YJR121W::kanMX4
YIL124W	AYR1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YIL124W::kanMX4
YKR068C	BET3	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YKR068C::kanMX4
YJL031C	BET4	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YJL031C::kanMX4
YHR101C	BIG1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YHR101C::kanMX4
YGR036C	CAX4	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YGR036C::kanMX4
YBR131W	CCZ1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBR131W::kanMX4
YGL206C	CHC1*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YGL206C::kanMX4
YGR167W	CLC1*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YGR167W::kanMX4
YML112W	CTK3	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YML112W::kanMX4
YGR088W	CTT1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YGR088W::kanMX4
YGL027C	CWH41	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YGL027C::kanMX4
YOL052C-A	DBR2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YOL052C-A::kanMX4
YAL026C	DRS2	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YAL026C::kanMX4
YLR372W	ELO3	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YLR372W::kanMX4

Tabelle 3: Fortsetzung

ORF	GEN	STAMM	GENOTYP
YNL084C	END3	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YNL084C::kanMX4
YGL012W	ERG4	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGL012W::kanMX4
YML008C	ERG6	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YML008C::kanMX4
YML067C	ERV41	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YML067C::kanMX4
YFR019W	FAB1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YFR019W::kanMX4
YCL011C	GBP2	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YCL011C::kanMX4
YEL042W	GD1	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YEL042W::kanMX4
YML004C	GLO1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YML004C::kanMX4
YER020W	GPA2	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YER020W::kanMX4
YOR371C	GPB1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YOR371C::kanMX4
YPL223C	GRE1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YPL223C::kanMX4
YLR113W	HOG1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YLR113W::kanMX4
YFL014W	HSP12	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YFL014W::kanMX4
YDR171W	HSP42	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YDR171W::kanMX4
YGL253W	HXK2	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGL253W::kanMX4
YR094C	HXT1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YHR094C::kanMX4
YMR011W	HXT2	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YMR011W::kanMX4
YHR092C	HXT4	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YHR092C::kanMX4
YJR118C	ILM1	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YJR118C::kanMX4
YCR071C	IMG2	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YCR071C::kanMX4
YGL203C	KEX1*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGL203C::kanMX4
YNL238W	KEX2*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YNL238W::kanMX4
YNL322C	KRE1*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YNL322C::kanMX4
YGR166W	KRE11	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YGR166W::kanMX4
YDR483W	KRE2	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YDR483W::kanMX4
YPR159W	KRE6	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YPR159W::kanMX4
YBR199W	KTR4	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YBR199W::kanMX4
YOR181W	LAS17	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YOR181W::kanMX4
YDR027C	LUV1	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YDR027C::kanMX4
YDL054C	MCH1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YDL054C::kanMX4
YHR204W	MNL1*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YHR204W::kanMX4
YGL0124C	MON1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGL0124C::kanMX4
YGL038C	OCH1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGL038C::kanMX4
YOR085W	OST3	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YOR085W::kanMX4
YJL128C	PBS2	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YJL128C::kanMX4

Tabelle 3: Fortsetzung

ORF	GEN	STAMM	GENOTYP
YOR360C	PDE2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YOR360C::kanMX4
YCL043C	PDI1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YCL043C::kanMX4
YGL013C	PDR1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YGL013C::kanMX4
YNL231C	PDR16	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YNL231C::kanMX4
YBL005W	PDR3	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBL005W::kanMX4
YOR153W	PDR5	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YOR153W::kanMX4
YBL017C	PEP1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBL017C::kanMX4
YOR036W	PEP12*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YOR036W::kanMX4
YPL154C	PEP4*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YPL154C::kanMX4
YMR231W	PEP5	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YMR231W::kanMX4
YAL005W	PEX22	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YAL005W::kanMX4
YBR074W	PFF1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YBR074W::kanMX4
YMR123W	PKR1*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YMR123W::kanMX4
YPL268W	PLC1*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YPL268W::kanMX4
YGL008C	PMA1	BY4743	MAT α /MAT α ; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; his3 Δ 1/his3 Δ 1; met15 Δ 0/MET15; LYS2/lys2 Δ 0; YGL008C/YGL008C::kanMX4
YGL008C	PMA1**	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YGL008C-DAmP::kanMX4
YPL036W	PMA2	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YPL036W::kanMX4
YDL095W	PMT1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YDL095W::kanMX4
YNL055C	POR1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YNL055C::kanMX4
YEL060C	PRB1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YEL060C::kanMX4
YIL095W	PRK1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YIL095W::kanMX4
YJR059W	PTK2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YJR059W::kanMX4
YNL098C	RAS2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YNL098C::kanMX4
YJL204C	RCY1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YJL204C::kanMX4
YDR028C	REG1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YDR028C::kanMX4
YKL038W	RGT1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YKL038W::kanMX4
YDL138W	RGT2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YDL138W::kanMX4
YGL045W	RIM8	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YGL045W::kanMX4
YBR229C	ROT2	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YBR229C::kanMX4
YPL218W	SAR1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YPL218W::kanMX4
YDR164C	SEC1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; sec1-1::kanMX4 (Letal bei 37 °C)
YBL050W	SEC17**	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YBL050W-DAmP::kanMX4
YBR080C	SEC18**	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YBR080C-DAmP::kanMX4
YBR171W	SEC66	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBR171W::kanMX4
YLR292C	SEC72	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YLR292C::kanMX4

Tabelle 3: Fortsetzung

ORF	GEN	STAMM	GENOTYP
YOR035C	SHE4	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YOR035C::kanMX4
YHR206W	SKN7	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YHR206W::kanMX4
YNL243W	SLA2	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YNL243W::kanMX4
YIL147C	SLN1	BY4743	MAT α /MAT α ; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; his3 Δ 1/his3 Δ 1; met15 Δ 0/MET15; LYS2/lys2 Δ 0; YIL147C/YIL147C::kanMX4
YDR189W	SLY1**	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YDR189W-DAmP::kanMX4
YGR229C	SMI1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YGR229C::kanMX4
YDR477W	SNF1	BY4743	MAT α /MAT α ; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0; leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; his3 Δ 1/his3 Δ 1; met15 Δ 0/MET15; LYS2/lys2 Δ 0; YDR477W/YDR477W::kanMX4
YNR023W	SNF12	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YNR023W::kanMX4
YOR290C	SNF2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YOR290C::kanMX4
YJR104C	SOD1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YJR104C::kanMX4
YJL127C	SPT10	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YJL127C::kanMX4
YAL005C	SSA1*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YAL005C::kanMX4
YLL024C	SSA2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YLL024C::kanMX4
YBR283C	SSH1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBR283C::kanMX4
YLR006C	SSK1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YLR006C::kanMX4
YNR031C	SSK2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YNR031C::kanMX4
YDR297W	SUR2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YDR297W::kanMX4
YJL093C	TOK1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YJL093C::kanMX4
YBR126C	TPS1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBR126C::kanMX4
YDR074W	TPS2	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YDR074W::kanMX4
YJL129C	TRK1*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YJL129C::kanMX4
YKR050W	TRK2*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YKR050W::kanMX4
YML100W	TSL1	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YML100W::kanMX4
YCR084C	TUP1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YCR084C::kanMX4
YKR042W	UTH1	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YKR042W::kanMX4
YEL013W	VAC8*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YEL013W::kanMX4
YOR106W	VAM3	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YOR106W::kanMX4
YDL077C	VAM6	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YDL077C::kanMX4
YDL185W	VMA1*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YDL185W::kanMX4
YHR039C	VMA10*	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YHR039C::kanMX4
YPL234C	VMA11*	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YPL234C::kanMX4
YPR036W	VMA13*	BY4742	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; lys2 Δ 0; YPR036W::kanMX4
YHR026W	VMA16*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YHR026W::kanMX4
YBR127C	VMA2*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YBR127C::kanMX4
YGR105W	VMA21*	BY4741	MAT α ; ura3 Δ 0; leu2 Δ 0; his3 Δ 1; met15 Δ 0; YGR105W::kanMX4

Tabelle 3: Fortsetzung

ORF	GEN	STAMM	GENOTYP
YHR060W	VMA22*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YHR060W::kanMX4
YEL027W	VMA3*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YEL027W::kanMX4
YOR332W	VMA4*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YOR332W::kanMX4
YKL080W	VMA5*	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YKL080W::kanMX4
YLR447C	VMA6*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YLR447C::kanMX4
YGR020C	VMA7*	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YGR020C::kanMX4
YEL051W	VMA8*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YEL051W::kanMX4
YCL005W-A	VMA9*	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YCL005W::kanMX4
YHL035C	VMR1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YHL035C::kanMX4
YOR270C	VPH1*	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YOR270C::kanMX4
YKL119C	VPH2*	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YKL119C::kanMX4
YKR001C	VPS1*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YKR001C::kanMX4
YBR097W	VPS15	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YBR097W::kanMX4
YOR089C	VPS21	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YOR089C::kanMX4
YPL065W	VPS28*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YPL065W::kanMX4
YLR240W	VPS34	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YLR240W::kanMX4
YDR080W	VPS41	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YDR080W::kanMX4
YKR020W	VPS51*	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YKR020W::kanMX4
YLR337C	VRP1	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YLR337C::kanMX4
YGR281W	YOR1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YGR281W::kanMX4
YBR183W	YPC1	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YBR183W::kanMX4
YDL235C	YPD1	BY4743	MATa/MATα; ura3Δ0/ura3Δ0; leu2Δ0/leu2Δ0; his3Δ1/his3Δ1; met15Δ0/MET15; LYS2/lys2Δ0; YDL235C/YDL235C::kanMX4
YML001W	YPT7	BY4741	MATa; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; met15Δ0; YML001W::kanMX4
YJL139C	YUR1	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YJL139C::kanMX4
YDR484W	YVPS52	BY4742	MATα; ura3Δ0; leu2Δ0; his3Δ1; lys2Δ0; YDR484W::kanMX4

2.2. Kultivierungsbedingungen

2.2.1. Bakterien

LB-Medium

Trypton	1,0	%
Hefeextrakt	0,5	%
Natriumchlorid	0,5	%
(Agar)	1,5	%

Ampicillin-Stocklösung

Ampicillin-Natriumsalz	50	mg/ml
------------------------	----	-------

Die Lösung wurde in 50 % Ethanol (v/v) angesetzt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

E. coli-Flüssigkulturen wurden unter Schütteln (220 rpm) bei 37 °C, Agar-Platten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Plasmid-tragende *E. coli*-Kulturen wurden durch Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) selektiert.

2.2.2. Hefen

YPD-Medium

Glucose	2,0	%
Pepton	2,0	%
Hefeextrakt	1,0	%
(Agar)	1,5	%

SC-Medium

Glucose	2,0	%
Ammoniumsulfat	0,5	%
SC-Aminosäuremix	0,087	%
YNB	0,17	%
(Agar)	1,5	%

Glucose und Agar wurden getrennt autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde das YNB sterilfiltriert hinzugegeben.

SC-Aminosäuremix

Adenin	2,5 g	Leucin	3,6 g	Threonin	12,0 g
Arginin	1,2 g	Lysin	1,8 g	Tyrosin	1,8 g
Aspartat	6,0 g	Methionin	1,2 g	Tryptophan	1,2 g
Glutamat	6,0 g	Phenylalanin	3,3 g	Valin	9,0 g
Histidin	1,2 g	Serin	22,5 g	Uracil	1,2 g

Zur Herstellung eines selektiven (d/o) Aminosäuremix wurden die entsprechenden Aminosäuren bzw. Basen ausgelassen; die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Die Kultivierung von Hefezellen erfolgte bei 30 °C im Inkubator bzw. Schüttler (220 rpm).

2.2.3 Kryokultivierung von Bakterien und Hefen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Hefe- und Bakterienstämmen wurden Kryokulturen durch Zugabe eines Volumenäquivalents sterilen Glycerols (99 %) angefertigt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.3. Molekularbiologische Methoden**2.3.1. Plasmide**

Tabelle 4 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte im *Multi Copy*-Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO, welcher zur Sequenzierung und Expression eingesetzt wurde. Einige K1-Derivate lagen zudem subkloniert im Centromervektor pRS316 vor und sind durch (*) gekennzeichnet. In **Tabelle 5** sind die verwendeten Konstrukte im Expressionsvektor pYX242 dargestellt.

Die Eigenschaften der Grundvektoren können jeweils der ersten Zeile der entsprechenden Tabelle entnommen werden. Standardmäßig besitzen alle aufgeführten Konstrukte 5'-Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *EcoRI* sowie 3'-Erkennungssequenzen für *BglIII*, *SallI*, *AvrII* und *HindIII*.

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Konstrukte im Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO. AS: Aminosäure, UE: Untereinheit. Derivate, die ebenfalls im Vektor pRS316 vorlagen sind mit (*) gekennzeichnet.

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN	REFERENZ
pYES2.1/V5-His-TOPO	<i>S. cerevisiae</i> -Expressionsvektor (5,9 kb), GAL1-Promotor, pUC <i>Origin</i> , 2 μ <i>Origin</i> , f1 <i>Origin</i> , URA3-Marker, Amp ^R , C-terminaler V5- und (His) ₆ -Tag.	Thermo Fisher
pRS316	<i>S. cerevisiae</i> -Expressionsvektor (6,8 kb), <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , f1 <i>Origin</i> , lacZ/MCS, URA3-Marker, Amp ^R	Sikorski & Hieter, 1989
pYES2.1 (Leervektor)	pYES2.1/V5-His-TOPO-Vektor ohne Insert	Sendzik, 2003
K1-pptox	K1-Volllängentoxin mit Präpro-Region (pptox)	F. Breinig
K1-tox	K1-Volllängentoxin ohne Präpro-Region (SS)	F. Breinig
K1-Letalkonstrukte		
K1-α(SS)*	K1- α -UE mit K1-Präpro-Region (SS)	F. Breinig
K1-α*	K1- α -UE ohne K1-Präpro-Region (SS)	F. Breinig
K1-$\alpha\gamma$(SS)*	K1- α (SS) mit C-terminaler vollständiger K1- γ -UE	F. Breinig
K1-$\alpha\gamma$*	K1- α mit C-terminaler vollständiger K1- γ -UE	F. Breinig
K1-$\alpha\gamma$39(SS)*	K1- α (SS) mit verkürzte K1- γ -UE (39 AS verbleibend)	F. Breinig
K1-$\alpha\gamma$39*	K1- α mit verkürzter K1- γ -UE (39 AS verbleibend)	F. Breinig
K1-αRR(SS)	K1- α (SS) mit C-terminalen Di-Argininreste (RR)	F. Breinig
K1-αRR	K1- α mit C-terminalen Di-Argininreste (RR)	F. Breinig
K1-αR(SS)	K1- α (SS) mit C-terminalem Argininrest (R)	Diese Arbeit
K1-αR	K1- α mit C-terminalem Argininreste (R)	Diese Arbeit
K1-Konstrukte mit Peptid-Tag		
K1-pptox-α_{V5}	K1-Volllängentoxin mit C-terminalem V5-Tag an α -UE	Diese Arbeit
K1-pptox-β_{FLAG}	K1-Volllängentoxin mit C-terminalem Flag-Tag an β -UE	Diese Arbeit
K1-α(SS)_{V5}	K1- α (SS) mit C-terminalem V5-Tag	Diese Arbeit
K1-α_{V5}	K1- α mit C-terminalem V5-Tag	F. Breinig
K1-Volllängenkonstrukte mit substituierten Cysteinresten		
K1-C92S	K1-Volllängentoxin, Cys92→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C95S	K1-Volllängentoxin, Cys95→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C107S	K1-Volllängentoxin, Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C239S	K1-Volllängentoxin, Cys239→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C248S	K1-Volllängentoxin, Cys248→Ser in β -UE	Diese Arbeit

Tabelle 4: Fortsetzung

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN	REFERENZ
K1-Volllängenkonstrukte mit substituierten Cysteinresten		
K1-C312S	K1-Volllängentoxin, Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C92-95S	K1-Volllängentoxin, Cys92/Cys95→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C92-107S	K1-Volllängentoxin, Cys92/Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C95-107S	K1-Volllängentoxin, Cys95/Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C92-95-107S	K1-Volllängentoxin, Cys92/Cys95/Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C239-248S	K1-Volllängentoxin, Cys239/Cys248→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C239-312S	K1-Volllängentoxin, Cys238/Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C248-312S	K1-Volllängentoxin, Cys248/Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C239-248-312S	K1-Volllängentoxin, Cys238/Cys248/Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-Letalkonstrukte mit substituierten Cysteinresten		
K1-α(SS) C92S	K1- α (SS), Cys92→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C95S	K1- α (SS), Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C107S	K1- α (SS), Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C92-95S	K1- α (SS), Cys92/Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C92-107S	K1- α (SS), Cys92/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C95-107S	K1- α (SS), Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C92-95-107S	K1- α (SS), Cys92/Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92S	K1- α , Cys92→Ser	Diese Arbeit
K1-α C95S	K1- α , Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α C107S	K1- α , Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92-95S	K1- α , Cys92/Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92-107S	K1- α , Cys92/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C95-107S	K1- α , Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92-95-107S	K1- α , Cys92/Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-Volllängenkonstrukte mit Mutationen in der Prä- und Pro-Region		
K1-K28-Prä	K1-Volllängentoxin mit K28-ER-Importsequenz (K28-Prä)	Diese Arbeit
K1-K28-Pro	K1-Volllängentoxin mit K28-Pro-Region und K1-Prä-Region	Diese Arbeit
K1-K28(SS)	K1-Volllängentoxin mit K28-Präpro-Region (K28 (SS))	Diese Arbeit
K1-MFA-Prä	K1-Volllängentoxin mit ER-Importsequenz des α -Faktors (MFA, YPL187W)	Diese Arbeit
K1-P43K	K1-Volllängentoxin, Pro43→Lys in Pro-UE	Diese Arbeit

Tabelle 4: Fortsetzung

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN	REFERENZ
K1-Volllängenkonstrukte mit Mutationen in der Prä- und Pro-Region		
K1-R44A	K1-Volllängentoxin, Arg44→Ala in Pro-UE	Diese Arbeit
K1-Letalkonstrukte mit Mutationen in der Prä- und Pro-Region		
K1α(SS)-K28-Prä	K1- α mit K28-ER-Importsequenz (K28-Prä)	Diese Arbeit
K1-α(SS)-K28-Pro	K1- α mit K28-Pro-Region und K1-Prä-Region	Diese Arbeit
K1-α-K28(SS)	K1- α mit K28-Präpro-Region (K28 (SS))	Diese Arbeit
K1-α(SS)-MFA-Prä	K1- α mit ER-Importsequenz des α -Faktors (MFA, YPL187W)	Diese Arbeit
K1-α(SS)-P43K	K1- α (SS) mit Pro43→Lys in Pro-UE	Diese Arbeit
K1-α(SS)-R44A	K1- α (SS) mit Arg44→Ala in Pro-UE	Diese Arbeit
K1-Volllängenkonstrukte mit Mutationen in der γ-Untereinheit		
K1-K187L	K1-Volllängentoxin, Lys186→Leu	Diese Arbeit
K1-N181Q	K1-Volllängentoxin, Asn181→Gln in γ -UE	Diese Arbeit
K1-N203Q	K1-Volllängentoxin, Asn203→Gln in γ -UE	Diese Arbeit
K1-N216Q	K1-Volllängentoxin, Asn216→Gln in γ -UE	Diese Arbeit
K1-N181-203Q	K1-Volllängentoxin, Asn181/Asn203→Gln in γ -UE	Diese Arbeit
K1-N181-216Q	K1-Volllängentoxin, Asn181/Asn216→Gln in γ -UE	Diese Arbeit
K1-N203-216Q	K1-Volllängentoxin, Asn203/Asn216→Gln in γ -UE	Diese Arbeit
K1-N181-203-216Q	K1-Volllängentoxin, Asn181/Asn203/Asn216→Gln in γ -UE	Diese Arbeit
K1-K28γ	K1- Volllängentoxin mit K28- γ -UE	Diese Arbeit

Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten Konstrukte im Vektor pYX242. UE: Untereinheit

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN	REFERENZ
pYX242 (Leervektor)	Hefe-Expressionsvektor (10 kb), konstitutiver TPI-Promoter, Amp ^R , Leucin-Marker	Addgene
K1-pptox	K1-Volllängentoxin mit Präproregion (pptox)	F. Breinig
K1-tox	K1-Volllängentoxin ohne Präpro-Region (SS)	F. Breinig
K1-K186L	K1-Volllängentoxin, Lys186→Leu, Mutation der potentiellen Kex2p-Schnittstelle in γ -UE	Diese Arbeit
K1-C92S	K1-Volllängentoxin, Cys92→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C95S	K1-Volllängentoxin, Cys95→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C107S	K1-Volllängentoxin, Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C239S	K1-Volllängentoxin, Cys239→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C248S	K1-Volllängentoxin, Cys248→Ser in β -UE	Diese Arbeit

Tabelle 5: Fortsetzung

BEZEICHNUNG	EIGENSCHAFTEN	REFERENZ
K1-C312S	K1-Volllängentoxin, Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C92-95S	K1-Volllängentoxin, Cys92/Cys95→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C92-107S	K1-Volllängentoxin, Cys92/Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C95-107S	K1-Volllängentoxin, Cys95/Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C92-95-107S	K1-Volllängentoxin, Cys92/Cys95/Cys107→Ser in α -UE	Diese Arbeit
K1-C239-248S	K1-Volllängentoxin, Cys239/Cys248→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C239-312S	K1-Volllängentoxin, Cys238/Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C248-312S	K1-Volllängentoxin, Cys248/Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-C239-248-312S	K1-Volllängentoxin, Cys238/Cys248/Cys312→Ser in β -UE	Diese Arbeit
K1-α(SS) C92S	K1- α (SS), Cys92→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C95S	K1- α (SS), Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C107S	K1- α (SS), Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C92-95S	K1- α (SS), Cys92/Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C92-107S	K1- α (SS), Cys92/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C95-107S	K1- α (SS), Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α(SS) C92-95-107S	K1- α (SS), Cys92/Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92S	K1- α , Cys92→Ser	Diese Arbeit
K1-α C95S	K1- α , Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α C107S	K1- α , Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92-95S	K1- α , Cys92/Cys95→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92-107S	K1- α , Cys92/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C95-107S	K1- α , Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit
K1-α C92-95-107S	K1- α , Cys92/Cys95/Cys107→Ser	Diese Arbeit

2.3.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt eine *in vitro* Methode zur Amplifizierung spezifischer DNA Sequenzen dar, wobei einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) komplementär an die 5'- bzw. 3'-Bereiche der entsprechenden DNA-Sequenz binden. Durch die zyklische Wiederholung des gewählten PCR-Programmes kommt es im Laufe der Reaktion zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA-Fragmente. Oligonukleotide, die für die Durchführung einer standardmäßigen PCR verwendet wurden, sind in **Tabelle 6** aufgeführt.

Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes

PCR-Puffer (mit MgCl ₂)	2,5	µl
3'-Primer (100 mM)	0,25	µl
5'-Primer (100 mM)	0,25	µl
dNTPs	0,5	µl
Template	200-300	ng
Polymerase	0,25	µl
H ₂ O _{steril}	ad 25	µl

Die Durchführung der PCR erfolgte im Thermocycler *MasterCycler Nexus* (Eppendorf) nach folgendem Programm. Die *Annealing*-Temperatur sowie die Anzahl der PCR-Zyklen wurden an die Schmelztemperatur der jeweils verwendeten Primer bzw. an das eingesetzte Template angepasst.

Ablauf eines Standard-PCR-Programms

	95 °C	2 min	
<i>Denaturierung</i>	95 °C	20 s	x 30 Zyklen
<i>Annealing</i>	59 °C	20 s	
<i>Elongation</i>	72 °C	90 s	
	72 °C	7 min	

Zur Kontrolle der DNA-Amplifizierung wurde der PCR-Ansatz mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Produkt ggf. reisoliert (2.3.3.).

2.3.2.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Durchführung einer standardmäßigen PCR sind in **Tabelle 6** aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide in 5'-3'-Orientierung. Unterstrichen: Start- und Stoppcodons, *Kursiv*: Restriktionsschnittstellen, Basen des V5-Tags sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

BEZEICHNUNG	5'-3' SEQUENZ
5' K1-pptox	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> CTC GAG GAA TTC <u>ATG</u> ACG AAG CCA ACC CAA GTA TTA GTT AGA
5' K1- α	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> CTC GAG GAA TTC <u>ATG</u> GAA GCG CCG TGG TAT GAC AAG ATC TG
3' K1-pptox	<i>BglIII</i> <i>AvrII</i> <i>NotI</i> AAG CTT CCT AGG GCGGCCGC <u>CTA</u> GTG GCC TGT GTC
3' K1- α	<i>BglIII</i> <i>Sall</i> <i>AvrII</i> <i>HindIII</i> AGA TCT GTC GAC CCT AGG AAG CTT <u>TTA</u> AGC AAC GGT AGC GCC ATT AGG ATC TGC
3' K1- α R	<i>BglIII</i> <i>Sall</i> <i>AvrII</i> <i>HindIII</i> AGA TCT GTC GAC CCT AGG AAG CTT <u>TTA</u> ACG AGC AAC GGT AGC GCC ATT AGG AT
3' K1- α RR	<i>BglIII</i> <i>Sall</i> <i>AvrII</i> AGA TCT GTC GAC AAG CTT <u>TTA</u> ACG ACG AGC AAC GGT AGC GCC ATT AGG AT
3' K1- α _{V5}	<i>BglIII</i> <i>Sall</i> <i>AvrII</i> V5-Tag AGA TCT GTC GAC AAG CTT <u>TTA</u> cgt aga atc gag acc gag gag agg gtt agg gat agg ctt acc AGC AAC GGT AGC GCC ATT AGG ATC TG
3' K1- γ	<i>BglIII</i> <i>Sall</i> <i>HindIII</i> AGA TCT GTC GAC AAG CTT <u>TTA</u> ACG CTT GGC CAC TGC TGG AAT G
3' K1- γ (39)	<i>BglIII</i> <i>Sall</i> <i>HindIII</i> AGA TCT GTC GAC AAG CTT <u>TTA</u> GAC ATA TTG TGA TGC GTT AGC TGG GAG TAT ACT AAT AC

2.3.3. Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (10 x)

Tris	890	mM
Borsäure	890	mM
Na ₂ -EDTA	20	mM

5 x GLB-Puffer

Glycerol	50	% (v/v)
SDS	1	% (w/v)
Na ₂ -EDTA	125	mM
Bromphenolblau	0,05	% (w/v)
Xylencyanol	0,05	% (w/v)

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten im elektrischen Feld unter Verwendung einer Agarosegel-Matrix. Standardmäßig wurden einprozentige Agarosegele in 1 x TBE-Puffer verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit GLB-Puffer versetzt und in definierte Taschen des Agarosegels eingefüllt; als Größenstandard wurde der Marker *HyperLadder 1 kb* (Bioline) eingesetzt. Zur Visualisierung der DNA- bzw. RNA-Fragmente wurde das Agarosegel in Ethidiumbromid-Lösung (2,5 µg/ml) inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des *ChemiDoc XRS Systems* und der Analyse-Software *Quantity One 4.6.2* der Firma Bio-Rad. Zur Reisolation von DNA aus Agarosegelen wurde das *E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* der Firma Omega entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet.

2.3.4. Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Enzyme der Firma Thermo Fisher verwendet. Die Verwendung der Puffer bzw. der Enzymmenge wurde entsprechend der Angaben des Herstellers gewählt.

Zusammensetzung eines Standard-Restriktionsverdaus

10 x Puffer	2,0	µl
Restriktionsendonuklease I	0,4	µl
Restriktionsendonuklease II	0,4	µl
RNase A	0,1	µl
DNA	300-500	ng
H ₂ O _{steril}	ad 20	µl

Nach erfolgter Inkubation bei 37 °C (1 h bis ü. N.) wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle eines präparativen Restriktionsverdaus wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel reisoliert und aufgereinigt (2.3.3.).

2.3.5. TOPO TA-Cloning

Zur Durchführung eines TOPO TA-Clonings wurde das *pYES2.1 TOPO TA Expression Kit* (Thermo Scientific) verwendet. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass Insert-Fragmente mit Adenin-Überhängen effizient und ohne zusätzliche Zugabe einer Ligase in den bereits linearisiert vorliegenden Vektor pYES2.1/V5-His-TOPO eingebracht werden können.

Durchführung

Während *Taq*-amplifizierte PCR-Produkte direkt für das TOPO TA Cloning eingesetzt werden können, wurden an cDNA-Templates (GeneArt, Thermo Scientific) zuvor 3'-Adenin-Überhänge angefügt. Hierzu wurden 400 ng der cDNA mit 1 µl Polymerasepuffer, 1 µl *Taq*-Polymerase (Sigma) und 0,1 µl dATP-Stocklösung (100 mM) versetzt und 15 min bei 72 °C im Thermocycler (*MasterCycler Nexus*, Eppendorf) inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 v/v), 2 µl 3 M Na-Acetat und 40 µl Ethanol (99 %), erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm (RT). Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das verbleibende Pellet wurde getrocknet, in 10 µl H₂O_{steril} aufgenommen und für das TOPO TA-Cloning eingesetzt. Das *pYES2.1 TOPO TA Expression Kit* wurde nach Herstellerangaben angewendet; ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen.

Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes

PCR-Produkt / cDNA	4,0 µl
Salz-Lösung	1,0 µl
pYES2.1/V5-His-Vektor	1,0 µl

Die transformierten *E. coli* TOP F10'-Zellen wurden mittels Ampicillin (50 µg/ml) selektiert. Die Plasmid-DNA ausgewählter Klone wurde mittels MiniPrep isoliert und mit Hilfe eines Restriktionsverdau unter Verwendung von *EcoRI* bzw. *XhoI* und *XbaI* auf eine korrekte 5'-3'-Ausrichtung überprüft. Zusätzlich wurde die DNA der Klone mit korrekter Insertgröße sequenziert (Eurofins Genomics, ehemals GATC), um potentielle Mutationen auszuschließen.

2.3.6. In-Fusion HD-Cloning

Zur Subklonierung von Inserts in den Expressionsvektor pYX242 wurde das *In-Fusion*® *HD-Cloning Kit* (Takara Bio USA) verwendet. Hierbei werden mit Hilfe spezifischer Primer (**Tabelle 7**) 15 bp-lange Überhänge mittels PCR an das gewünschte Insert angefügt, welche komplementär zu ausgewählten Sequenzen des Zielvektors sind. Das Kit wurde gemäß der Herstellerangaben verwendet, wobei die *Annealing*-Temperatur der PCR auf 63 °C gesetzt wurde; die *blunt end*-Linearisierung des Vektors erfolgte mit Hilfe von *SmaI*.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Primer des *In-Fusion HD-Cloning*. Schnittstellen der *Restriktionsenzyme* sind *kursiv* abgebildet, Start- und Stopp-Codons sind unterstrichen. Die **pYX242-komplementären Enden** sind in **fetter** Schrift hervorgehoben; zusätzlich ist die Punktmutation C312S (ACA→AGA) im entsprechenden 3'-Primer *kursiv* und unterstrichen dargestellt.

BEZEICHNUNG	5'-3' SEQUENZ
5' pYX-K1pptox	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> <i>NdeI</i>
	cttacggtgacc <i>CTC GAG GAA TTC CAT <u>ATG</u></i> ACG AAG CCA ACC CAA GTA TTA GTT AGA TCC
3' pYX-K1pptox	<i>BamHI</i> <i>Sall</i> <i>HindIII</i>
	atcatcggatacc <i>GGA TCC GTC GAC AAG CTT <u>CTA</u></i> GTG GCC TGT GTC ACA GCC TTC AAA G
3'- pYX-K1pptox-C312S	<i>BamHI</i> <i>Sall</i> <i>HindIII</i>
	atcatcggatacc <i>GGA TCC GTC GAC AAG CTT <u>CTA</u></i> GTG GCC TGT GTC <i><u>AGA</u></i> GCC TTC AAA G

2.3.7. Transformation von Mikroorganismen

2.3.7.1. Elektroporation von *E. coli*

Zur Anzucht elektrokompenter *E. coli* wurde LB-Medium einprozentig mit einer frischen Übernachtskultur des *E. coli*-Stammes TOP10 beimpft und bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) bis zu einer maximalen OD₆₀₀ von 0,9 inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Falcons überführt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 8.000 rpm, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem, sterilem Glycerol (10 %) wurde das Pellet im Rückfluss resuspendiert, in geeignete Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert (5 min, 8.000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde im äquivalenten Volumen sterilem Glycerol (10 %) aufgenommen. Die nun elektrokompenten Zellen wurden à 40 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5	%
Pepton	2,0	%
Natriumchlorid	10	mM
Glucose	20	mM
Kaliumchlorid	10	mM
Magnesiumchlorid	10	mM
Magnesiumsulfat	2,5	mM

Das SOC-Medium wurde autoklaviert.

Durchführung

Mit Hilfe einer Elektroporation wird die Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente Mikroorganismen ermöglicht. Hierzu wird mittels eines elektrischen Impulses eine kurzzeitige Porenbildung in der Zellmembran induziert, wodurch extrazellulär applizierte DNA in das Zellinnere gelangen kann (Calvin & Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988). Zur Elektroporation wurden 200-300 ng Plasmid-DNA zu einem Aliquot elektrokompetenter *E. coli*-Zellen gegeben und die Zellsuspension wurde in eine Elektroporationsküvette (Bio-Rad) überführt. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser XCell*TM (Bio-Rad) bei 200 Ω Widerstand, einer elektrischen Feldstärke von 2,5 kV/cm und einer elektrischen Kapazität von 25 μ F. Die Zellen wurden in 500 μ l SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C (220 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf selektive LB-Platten ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

2.3.7.2. Lithiumacetat-Transformation von Hefen**10 x Lithiumacetat (LiAc)**

Lithiumacetat	1	M
---------------	---	---

10 x TE

Tris-HCl	100	mM
Na ₂ -EDTA	10	mM

50 % PEG

PEG-4000	50	% (w/v)
----------	----	---------

Gebrauchslösungen

1 x LiAc/TE-Lösung		PEG-Lösung		1 x TE	
10 x LiAc	10 %	10 x LiAc	10 %	10 x TE	10 %
10 x TE	10 %	10 x TE	10 %	H ₂ O _{steril}	90 %
H ₂ O _{steril}	80 %	50 % PEG	80 %		

Durchführung

Zur Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte mittels Lithiumacetat-Methode nach Ito *et al.*, (1983). Hierbei wird die DNA-Aufnahmefähigkeit der Hefezellen durch die Inkubation mit Alkali-Kationen stark erhöht und somit die Transformationseffizienz deutlich gesteigert. 1 ml einer frischen Übernachtskultur der zu transformierenden Hefe wurde abzentrifugiert, gewaschen und anschließend in 100 µl LiAc/TE-Puffer aufgenommen. Standardmäßig wurden 200-400 ng Plasmid-DNA mit 10 µl Carrier-DNA (D1626, Sigma) und 3 µl 10 x LiAc gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach Zugabe von 600 µl PEG-Lösung erfolgten eine Inkubation von 30 min bis ü. N. bei 30 °C (220 rpm) sowie ein Hitzeschock (42 °C im Wasserbad). Die Zellen wurden anschließend zweifach in 1 x TE-Puffer gewaschen, in 500 µl 1 x TE resuspendiert und auf geeigneten Selektiv-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation der transformierten Hefen erfolgte über 4 d bei 30 °C. Im Fall einer Co-Transformation wurde der gleiche DNA-Gehalt beider Plasmide eingesetzt.

2.3.8. Plasmid-Isolierung aus *E. coli***2.3.8.1. Alkalische Lyse****GTE-Puffer**

Glucose	2,0 %
Tris	25 mM
Na ₂ -EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt; die Lösung wurde autoklaviert.

NaOH/SDS-Lösung

Natriumhydroxid	200 mM
SDS	1 % (w/v)

Die Lösung wurde autoklaviert.

KAc-Lösung

Eisessig (98 %)	29,5 ml
H ₂ O _{steril}	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde mit KOH auf pH 4,8 eingestellt; die Lösung wurde autoklaviert.

Durchführung

Die alkalische Lyse ist eine Methode zur selektiven Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien. Hierzu wurden 1,5 ml einer frischen Übernachtskultur abzentrifugiert (20 s, 13.000 rpm, RT) und das resultierende Pellet wurde in 100 µl GTE-Puffer aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurden 200 µl NaOH/SDS-Lösung zugegeben, welche nach Inkubation (3 min, RT) durch Zugabe von 150 µl Kaliumacetat neutralisiert wurde. Auf diese Weise renaturieren die Plasmid-DNA-Einzelstränge, während chromosomale DNA präzipitiert. Nach Inkubation (5 min auf Eis) und Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde der klare Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt. Die enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 800 µl Ethanol (99 %) gefällt und durch Zentrifugation (3 min, 13.000 rpm, RT) pelletiert; das getrocknete Pellet wurde in 30 µl H₂O_{steril} aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.3.8.2. MiniPrep und MidiPrep

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien mit Hilfe einer so genannten MiniPrep bzw. MidiPrep beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Zur Durchführung einer MiniPrep wurde das *innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0* (Analytik Jena) angewendet. Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus größeren Kulturvolumina wurde das *GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit* (Sigma) verwendet. Die Anwendung beider Kits erfolgte nach Angaben der jeweiligen Hersteller; die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.3.9. Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Breaking-Puffer

TritonX-100s	2	%
SDS	1	%
Natriumchlorid	100	mM
Tris	10	mM
Na ₂ -EDTA	1	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

TE-EDTA-Puffer (10 x)

Tris	100	mM
Na ₂ -EDTA	10	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Zur Isolierung genomischer DNA aus Hefe wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur abzentrifugiert (3 min, 11.000 rpm, RT), mit H₂O_{steril} gewaschen und in 20 µl Breaking-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen und 20 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol erfolgte der Zellaufschluss im Homogenisator (3 min, 6.000 rpm). Zum Zelllysat wurden 20 µl TE-Puffer zugegeben, die Proben erneut durchmischt und zentrifugiert (5 min, 12.500 rpm, 4 °C). Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml Ethanol (99 %) bei -20 °C für 30 min. Nach einer erneuten Zentrifugation (3 min, 12.500 rpm, 4 °C) wurden der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und die enthaltene DNA in 30 µl H₂O_{steril} gelöst.

2.3.10. Isolierung doppelsträngiger RNA aus Hefe

DEPC-H₂O_{steril}

H₂O wurde mit 0,2 % (v/v) DEPC (Diethylidicarbonat) versetzt und autoklaviert. Lösungen zur RNA-Isolation wurden mit DEPC-behandeltem H₂O_{steril} hergestellt.

Tris-Sulfat (50 mM)

Tris	50	mM
------	----	----

Der pH-Wert wurde mit H₂SO₄ auf 9,3 eingestellt.

Tris-HCl

Tris	10	mM
Natriumchlorid	100	mM
Na ₂ -EDTA	10	mM
SDS	0,2	%

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

20 x SSC

Natriumchlorid	3,0	M
Natriumcitrat	0,3	M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt.

4 M LiCl in 2 x SSC

20 x SSC	2,0	ml
DEPC-H ₂ O _{steril}	18	ml
Lithiumchlorid	3,4	g

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

STE-Puffer

Tris	10	mM
Natriumchlorid	100	mM
Na ₂ -EDTA	1	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

Durchführung

Doppelsträngige RNA wurde mittels Aqua Roti-Phenol mit anschließender LiCl-Präzipitation isoliert. Hierzu wurden 4 ml einer frischen Übernachtskultur der entsprechende Hefe abzentrifugiert (5 min, 8.000 rpm, RT) und mit 1 ml EDTA (50 mM, pH 7,0) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml Tris-SO₄ (50 mM, pH 9,3) resuspendiert, mit β-Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 2,5 % versetzt und 20 min bei 20 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (3 min, 14.000 rpm, RT) wurde das Pellet in 400 µl Tris-HCl resuspendiert, mit 400 µl *Roti®-Aqua-Phenol* (Roth) komplementiert und 1 min kräftig durchmischt. Nach einer Inkubation für 5 min bei 20 °C erfolgte eine Phasentrennung mittels Zentrifugation (5 min, 14.000 rpm, 4 °C). Die RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl *UltraPure™*

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1, v/v; Thermo Scientific) versetzt. Nach einer zweiten Phasentrennung (10 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurden der resultierenden wässrigen Phase 3 M Na-Acetat (pH 5,2) sowie ein Volumenäquivalent eiskaltes Ethanol (100 %) zugegeben; die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte für 2 h bis ü. N. bei -20 °C. Das resultierende Pellet (15 min, 12.000 rpm, 4 °C) wurde in 100 µl DEPC-haltigem H₂O_{steril} aufgenommen, mit 100 µl 4 M LiCl in 2 x SSC-Puffer versetzt und ü. N. bei 4 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 12.000 rpm, 4 °C) wurde die Salzkonzentration des resultierenden Überstandes durch Zugabe eines Volumenäquivalents eiskalten Ethanol (100 %) verringert (1 h, -20 °C). Die Nukleinsäuren wurden pelletiert (15 min, 12.000 rpm, 4 °C) und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und abschließend in 20 µl STE-Puffer resuspendiert; die Visualisierung der dsRNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

2.3.11. RT-PCR

Zur Sequenzierung des viralen M-Genoms wurde die isolierte dsRNA mit Hilfe des *OneTaq® One-Step RT-PCR Kits* (NEB) sowohl in cDNA umgeschrieben als auch per PCR-Amplifikation vervielfältigt. Die verwendeten Primer sind in **Tabelle 8** aufgelistet. Die Durchführung der RT-PCR erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei aufgrund der starken Sekundärstrukturen eine Denaturierung der dsRNA für 5 min bei 65 °C vor der cDNA-Synthese durchgeführt wurde. Zur PCR-Amplifikation wurde eine *Annealing*-Temperatur von 60 °C gewählt.

Tabelle 8: Übersicht verwendeten *One-Step RT-PCR-Primer*. Schnittstellen für *Restriktionsenzyme* sind *kursiv* dargestellt, Start- und Stoppcodons sind unterstrichen. Die Sequenzen der **viralen M-dsRNA** sind in **fetter Schrift** hervorgehoben.

BEZEICHNUNG	5'-3' SEQUENZ
5' M1	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i> GAA TTC CTC GAG GAAAAATAAAGAA ATG ACG AAG CCA ACC C
5' K1	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> CTC GAG GAA TTC <u>ATG</u> ACG AAG CCA ACC CAA GTA TTA G
3' M1	<i>HindIII</i> <i>AvrII</i> AAG CTT CCT AGG TGA TGT GTG TTT CTT CTA TGC
3' K1	<i>HindIII</i> <i>AvrII</i> AAG CTT CCT AGG <u>CTA</u> GTG GCC TGT GTC

2.4. Mikrobiologische Methoden

2.4.1. Bestimmung der optischen Dichte und des pH-Wertes

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD_{600}) erfolgte über eine Messung der Extinktion bei 600 nm unter Verwendung des Spektralphotometers *Ultrospec 2100 Pro* (Amersham Biosciences). Der pH-Wert einer Lösung wurde mit Hilfe des pH-Meters *Five Series pH Meter* (Mettler Toledo) ermittelt bzw. eingestellt.

2.4.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) an einer geeigneten Verdünnung der entsprechenden Kultur.

2.4.3. Herstellung von K1-Toxinkonzentraten

2.4.3.1. Verwendete Kulturmedien

McIlvaine-Puffer

Citrat	0,1	M
Na ₂ -Hydrogenphosphat	0,2	M

Zur Herstellung einer 10 mM Puffer-Lösung wurden beide Komponenten 1:10 mit H₂O verdünnt und bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4,7 gemischt.

JG-Medium

Glucose	1,00	%
Pepton	0,50	%
Hefeextrakt	0,75	%
Eisen(III)-Chlorid	$0,5 \times 10^{-3}$	%
Mangansulfat	$0,5 \times 10^{-3}$	%
Ammoniumsulfat	0,40	%
Magnesiumsulfat	0,05	%
Kaliumchlorid	0,08	%
Glycerol	5,2	%

Die Komponenten wurden in McIlvaine-Puffer (10 mM, pH 4,7) gelöst, Glucose wurde getrennt autoklaviert.

B-Medium

Glucose	2,00	%
meso-Inosit	0,004	%
tri-Natrium-Citrat-Dihydrat	0,05	%
Malat	2,00	%
Kaliumdihydrogenphosphat	0,10	%
Ammoniumsulfat	0,15	%
Magnesiumsulfat	0,205	%
Glycerol	20,0	%

Die Glucose wurde separat autoklaviert, der pH-Wert des Mediums wurde mit KOH auf 4,7 eingestellt.

100 x Vitaminstammlösung (1 l)**100 x Spurenelementstammlösung (1 l)**

4-Aminobenzoesäure	20	mg	Borsäure	200	mg
Biotin	20	mg	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200	mg
Folsäure	20	mg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	200	mg
Nicotinsäure	100	mg	AlCl ₃	200	mg
Riboflavin	50	mg	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	100	mg
Pyridoxalhydrochlorid	100	mg	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	100	mg
Calcium-D-Pantothenat	100	mg	Li ₂ SO ₄ x H ₂ O	100	mg
			KI	100	mg
			K-Hydrogentartrat	2000	mg

10 x Aminosäurestocklösung (1 l)

Alanin	0,75	g	Serin	0,5	g
Argininmonohydrochlorid	3,5	g	Threonin	2,0	g
Asparaginsäure	0,5	g	Tryptophan	0,4	g
Glutaminsäure	3,0	g	Leucin	0,5	g
Histidinmonochlorid	0,2	g	Uracil	0,2	g
Methionin	0,4	g	Adenin	0,2	g

Das B-Medium wurde durch Zugabe von 100 ml AS-Stammlösung (autoklaviert) und mit je 10 ml der 100 x Vitamin- bzw. Spurenelementlösung (sterilfiltriert) komplettiert. Die Lagerung der AS-, Vitamin- und Spurenelementlösung erfolgte in Aliquots bei -20 °C

YNB-D-Brij58

Glucose	1,00	%
YNB	0,67	%
Brij58	0,01	%

Die Komponenten wurden in McIlvaine-Puffer (10 mM, pH 4,7) gelöst, Glucose wurde separat autoklaviert.

2.4.3.2. Aufbereitung des Toxinkonzentrates

Zur Herstellung eines K1-Toxinkonzentrates wurde der *S. cerevisiae* K1-Killerstamm T158c zunächst in YPD-Medium ü. N. bei 30 °C inkubiert. Mit Hilfe dieses Inoculums wurde die Vorkultur im entsprechenden Kulturmedium angeimpft. Nach einer zweitägigen Inkubation (20 °C, 100 rpm) wurde das komplette Volumen zum Beimpfen der Hauptkultur verwendet, welche 3-5 d bei 20 °C und 100 rpm kultiviert wurde. Der zellfreie Überstand (10 min, 10.000 rpm, 4 °C) wurde mit Hilfe einer Amicon-Filtrationseinheit (Merck-Millipore) und entsprechenden Filtermembranen (PLCC07610, Merck-Millipore, 5 kDa) unter Anlegen von 1 bar Stickstoffdruck konzentriert. Das Toxinkonzentrat wurde anschließend über 3 d mit Hilfe eines *SnakeSkin*-Dialyseschlauchs (5 kDa, Thermo Scientific) gegen eine 10 mM McIlvaine-Puffer-Pufferlösung dialysiert. Die Toxizität jedes Toxinkonzentrates wurde im Agardiffusionstest unter Verwendung von Methylenblau-Agar (2.4.4.) überprüft.

2.4.4. Methylenblau-Agardiffusionstest**2.4.3.1. Intakte Hefezellen****Komplex-Methylenblau-Agar**

Glucose	2,00	%
(Galactose	3,00	%)
Pepton	2,00	%
Hefeextrakt	1,00	%
Citrat	1,92	%
Agar	1,50	%

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 4,7 eingestellt. Methylenblau wurde je nach gewünschtem Färbegrad zugegeben. Glucose und Agar wurden getrennt autoklaviert.

SC-Methylenblau-Agar

Glucose	2,00	%
(Galactose	3,00	%)
Ammoniumsulfat	0,50	%
Citrat	1,92	%
SC-Aminosäuremix	0,087	%
YNB	0,17	%
Agar	1,50	%

Der pH-Wert wurde mit K_2PO_4 auf 4,7 eingestellt. Methylenblau wurde je nach gewünschtem Färbegrad zugegeben; Glucose und Agar wurden getrennt autoklaviert, YNB wurde sterilfiltriert und nachträglich zugegeben. Der zugegebene Aminosäuremix wurde je nach verwendeten Selektionsmarkern angepasst.

Durchführung

Der Methylenblau-Agar (MBA)-Diffusionstest kann zur Untersuchung der Killeraktivität von Hefen bzw. der Ausbildung von Immunität gegen ein Killertoxin angewandt werden. Zur Analyse der Toxizität von natürlichen Killerhefen bzw. Transformanten wurden 10^6 Zellen eines sensitiven Hefestammes in verflüssigten und abgekühlten Agar eingebettet; nach Erstarren wurden potentiell Toxin-sezernierende Zellen auf den Agar aufgetropft (10^6 Zellen). Die Bestimmung der Ausbildung der funktionellen Immunität erfolgte analog durch Einbetten von 10^6 Zellen der zu untersuchenden Hefe bzw. Transformante. Wenn nicht anders vermerkt wurden 1.000 AU (*Arbitray Units*) eines K1-Toxinkonzentrates appliziert (Schematische Abbildung der Durchführung, **Abb. 4**). Nach einer Inkubation von 3 d bei 20 °C wurde die Ausbildung potentieller Hemmhöfe dokumentiert. Einer Toxinmenge, die im MBA einen Hemmhofdurchmesser von 10 mm gegen den sensitiven Wildtyp-Stamm BY4742 ausbildete, wurde eine Aktivität von 1.000 AU zugeordnet, so dass eine Vergleichbarkeit verschiedener Toxinkonzentrate möglich wurde. Das MBA-Medium wurde je nach Versuchsziel und Durchführung angepasst, eine genaue Angabe kann den entsprechenden Abbildungslegenden entnommen werden.

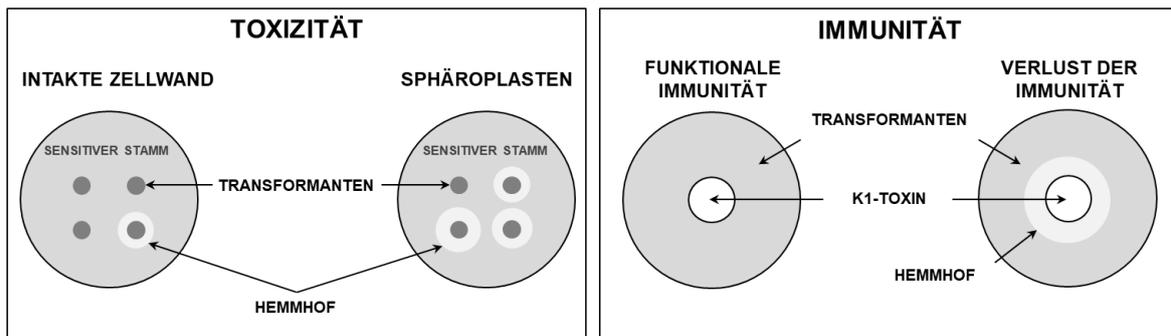


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Versuchsansätze zur Analyse von Toxizität bzw. Vermittlung der Immunität mutierter K1-Vorläuferproteine *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit den entsprechenden mutierten K1-Derivaten mittels Lithiumtransformation transformiert. Zur Untersuchung der Sekretion bzw. biologischen Aktivität der Toxinderivate (**Toxizität, links**) wurden 10^6 Zellen des sensitiven Stammes in Methyleneblau-Agar (SC-Galactose, pH 4,7, intakte Zellwand) eingebettet und 10^6 Zellen der Transformanten wurden auf dem Agar aufgetropft. Zusätzlich wurde die Toxizität auf sphäroplastierte sensitive Hefen untersucht, deren Zellwand enzymatisch entfernt wurde (Galactose-Regenerationsagar, pH 4,7, Sphäroplasten). Zur Untersuchung der Immunität wurden jeweils 10^6 Zellen der transformierten Hefen in Methyleneblau-haltigen Agar (Ura d/o-Galactose pH 4,7) eingebettet und 1.000 AU K1-Konzentrat in vorgestanzte Löcher appliziert (**Immunität, rechts**). Die Dokumentation potentieller Hemmhöfe erfolgte nach 3 d Inkubation (20 °C) der MBA-Platten.

2.4.4.2. Sphäroplasten

Regenerationsagar

Glucose	2,0	%
Pepton	2,0	%
Hefeextrakt	1,0	%
Sorbit	1,2	M
Agar	1,5	%

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 4,7 eingestellt. Methyleneblau wurde je nach gewünschtem Farbegrad zugegeben. Glucose und Agar wurden getrennt autoklaviert.

Inkubationspuffer

Tris-HCl	0,1	M
Na ₂ -EDTA	5,0	mM
Dithiothreitol	5,0	mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt und die Lösung wurde autoklaviert.

Sphäroplastierungspuffer

Sorbit	1,2	M
Na ₂ -Hydrogenphosphat	0,5	M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt, die Lösung wurde autoklaviert.

Sorbit-Puffer

Sorbit	1,2	M
--------	-----	---

Sorbit wurde in 0,1 M McIlvaine-Puffer (pH 4,7) gelöst und autoklaviert.

Durchführung

Aus einer frischen Übernacht-Kultur wurde 1 ml (ca. $2-5 \times 10^7$ Zellen) abzentrifugiert (5 min, 8.000 rpm, RT) und zweimal mit sterilen H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Inkubationspuffer resuspendiert und bei 30 °C inkubiert (150 rpm). Nach 30 min wurden die Zellen erneut mit sterilem H₂O gewaschen, in 900 µl Sphäroplastierungspuffer aufgenommen und mit 2 mg/ml Zymolyase 20T komplementiert (Stocklösung 20 mg/ml in Sphäroplastierungspuffer, sterilfiltriert). Die Sphäroplastierung erfolgte über ca. 2 h bei 30 °C unter leichtem Schütteln (max. 150 rpm) und wurde mikroskopisch überprüft. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 rpm, RT) wurden die Sphäroplasten zweimal mit Sorbit-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml Sorbit-Puffer resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension wurden in 5 ml flüssigen, abgekühlten Regenerationsagar pipettiert und über eine bereits feste Schicht Regenerationsagar (10 ml/Platte) gegossen. Nach Erstarren des Agars wurden die zu untersuchenden Zellen vorsichtig aufgetropft (10^6 Zellen), (**Abb. 4**, Toxizität). Nach einer Inkubation von 3 d bei 20 °C wurde die Bildung von Hemmhöfen dokumentiert. Das Vorhandensein von nicht sphäroplastierten Zellen wurde standardmäßig durch Waschen eines Aliquots mit sterilem H₂O und Ausplattieren der Zellen auf YPD-Agarplatten überprüft.

2.4.5. Serieller Verdünnungstest

Zur Untersuchung der letalen Wirkung intrazellulär exprimierter K1-Konstrukte wurde ein serieller Verdünnungstest durchgeführt. Hierzu wurde die entsprechende Hefekolonie zunächst in geeignetem Glucose-haltigem d/o-Medium angeimpft und ü. N. bei 30 °C (220 rpm) inkubiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und 10^7 Zellen wurden abzentrifugiert (20 s, 13.000 rpm, RT). Das Pellet wurde zweimal in d/o Raffinose-Medium gewaschen und anschließend in 50 µl d/o Raffinose-Medium aufgenommen. Es wurden logarithmische Verdünnungen in einem Endvolumen von 50 µl angefertigt und 5 µl jeder Verdünnung wurden je auf eine Glucose- bzw. Galactose-haltige Agarplatte des entsprechenden d/o Mediums aufgetropft. Die Platten wurden für 4 d bei 30 °C inkubiert und das Wachstum der Hefen wurde anschließend dokumentiert.

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Zellaufschluss mittels Glasperlen

SUMEB-Puffer

Harnstoff	8	M
MOPS pH 6,8	10	mM
Na ₂ -EDTA	10	mM
SDS	1	%
Ammoniumsulfat	0,2	M
Bromphenolblau	0,01	% (w/v)

MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) wurde sterilfiltriert und dem Puffer nach dem Autoklavieren zugegeben.

Zum Zellaufschluss wurde das gewünschte Volumen der Hefekultur pelletiert (5 min, 8.000 rpm, RT), mit 1 ml H₂O_{steril} gewaschen und in einem geeigneten Volumen SUMEB-Puffer resuspendiert. Zur Inhibierung proteolytisch-aktiver Enzyme wurde jedem Ansatz ein entsprechendes Volumen an EDTA-freiem *CComplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Merck, 25 x Stocklösung) zugegeben. Nach Zugabe von Glasperlen wurden die Zellen mit Hilfe eines Homogenisators (*PreCellys® Evolution*, Bertin Instruments) aufgeschlossen (3 x 30 s mit 30 s Pause, Schüttelfrequenz 6.000 rpm). Anschließend wurden die Ansätze 5 min bei 95 °C inkubiert, zentrifugiert und der Überstand zur SDS-PAGE eingesetzt.

2.5.2. TCA-Fällung

3 x SDS-Probenpuffer

Tris-HCl	2,0	ml
Glycerol	2,4	ml
SDS (10 %)	1,0	ml
H ₂ O _{steril}	4,0	ml
Coomassie Brilliant Blue (0,05 % w/v)	1,0	ml

Zur Herstellung von reduzierendem SDS-Probenpuffer wurde der Puffer mit 10 % β-Mercaptoethanol komplementiert.

Die Fällung von Proteinen über Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) stellt eine Methode zur Konzentration der Proben dar, die auf dem Entzug der Proteinhydrathülle beruht, was

eine Präzipitation der Proteine zur Folge hat. Neben einer Denaturierung der Proben werden gleichzeitig Salze entfernt. Zur Durchführung wird TCA (Endkonzentration 10 % v/v) zu den Proben gegeben und diese werden für 1 h auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet gegebenenfalls mit 100 % Aceton gewaschen. Nach Trocknen wurde das entsprechende Pellet in 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert und konnte für die SDS-PAGE eingesetzt werden.

2.5.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tris-HCl/SDS, pH 8,45

Tris	3	M
SDS	0,5	%

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,45 eingestellt.

Zusammensetzung der Tris/Tricin-Gele (ausreichend für zwei Gele)

	Trenngel		Sammelgel	
Rotiphorese	5,9	ml	1,6	ml
Tris-HCl/SDS pH 8,45	5,0	ml	3,1	ml
96 % Glycerol	3,1	ml	-	-
H₂O_{steril}	1,7	ml	7,8	ml
10 % APS	80	µl	80	µl
TEMED	25	µl	25	µl

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) stellt eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen anhand ihres Molekulargewichtes dar. Es wurde ein diskontinuierliches Gelsystem mit einem dem Trenngel aufgeschichteten Sammelgel verwendet, welches die Proben vor der eigentlichen Größenauftrennung fokussiert. Hierzu wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten mit definiertem Abstand (1,5 mm) gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach abgeschlossener Polymerisation der Komponenten wurde der Alkohol abdekantiert und das Sammelgel aufgeschichtet; die Geltaschen wurden durch einen adäquaten Taschenkamm definiert.

5 x Anodenpuffer

Tris	1	M
------	---	---

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,9 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

5 x Kathodenpuffer

Tris	3,0	M
Tricin	0,5	M
SDS	0,5	%

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Die Elektrophorese wurde mit Hilfe des *Mini-Protean II*-Systems von Bio-Rad durchgeführt. Die Proben wurden zunächst bei 80 V präfokussiert und anschließend 1,5-2 h bei 120 V aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde der Marker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) verwendet.

2.5.4. Western Blot**2.5.4.1. Semi-dry Blotting****Transferpuffer**

Tris	0,30	%
Glycin	1,44	%
SDS	0,10	% (w/v)
Methanol	20,0	% (w/v)

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Die verwendete PVDF-Trägermembran (Roche) wurde zunächst in Methanol (100 %) aktiviert und zusammen mit den eingesetzten Blottingpapieren in Transferpuffer äquilibriert. Die Immobilisierung der Proteine erfolgte über 90 min bei 55 mA pro Gel (1,5 mm Gele) in einer *Trans-Blot™ SD Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad).

2.5.4.2. Immunodetektion

10 x TBS

Tris	1	M
Natriumchlorid	1	M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Waschpuffer

Tween-20	0,1	% in 1 x TBS
----------	-----	--------------

Zur Herstellung von Blocking-Puffer wurden 5 % Magermilchpulver in Waschpulver gelöst.

Die Detektion der immobilisierten Proteine erfolgt durch die Inkubation mit spezifischen Antikörpern (**Tabelle 9**). Zunächst werden freie Bindungsstellen der verwendeten Membran durch eine Inkubation in Blocking-Puffer abgesättigt (1 h, RT). Die Hybridisierung mit dem primären Antikörper erfolgte ü. N. bei 4 °C, ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (5 min) mit Waschpuffer entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:5.000, anti-rabbit, Sigma A4416) erfolgte über 1 h (RT). Nach erneuten Waschschritten und Zugabe des Luminol-Substrates (*SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate*, Thermo Fisher) erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz-Signale mit Hilfe des *Amersham Imager 600-Systems* (GE Healthcare).

Tabelle 9: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten primären Antikörper und der entsprechenden Peptidkennungssequenzen.

BEZEICHNUNG	VERDÜNNUNG		ERKENNUNGSSEQUENZ	HERKUNFT
anti-K1, rabbit I	1:1.000	in α	DKIWEVKDWLLQRATDGNWGK	AG Thumm, Universität Göttingen
			KNCVGERKDDISTDCGK	
		in β	EESIDNANNDFEGCDTGH	
anti- α , rabbit	1:1.000		CGNRPVSQSDPNGAT	GenScript Biotech
anti- β , rabbit	1:1.000		CKLFSEDEGQWETNY	
anti- γ , rabbit	1:1.000		DISTVADGDIPLDFC	

2.5.5. Coomassie-Färbung

Der Triphenylmethan-Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* eignet sich für eine unspezifische Anfärbung von Proteinen, da er sich an basische Seitenketten der Aminosäuren anlagern kann. Zur Färbung von SDS-Gel wurden diese ü. N. in *InstantBlue* (Expedeon) inkubiert;

diese Coomassie-basierte Färbelösung erlaubt eine sensitive und schnelle Detektion von Proteinen, mit dem Vorteil eines ungefärbten Hintergrunds, wodurch ein späteres Entfärben der Gele entfiel.

2.6. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops *Biozero BZ-800* (Keyence) unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs (*PlanApo*; VC; NA: 1,40; Nikon) angefertigt.

2.7. Durchfluscytometrie

FACS-Fix-Lösung

Paraformaldehyd	10 g/l
Natriumchlorid	8,5 g/l

Die Chemikalien wurden bei 80 °C (Wasserbad) gelöst, der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt.

Eine quantitative Analyse der K1-induzierten Porenbildung wurde mit Hilfe einer Propidiumiodid-Färbung und anschließender durchfluscytometrischer Analyse (*Fluorescence-activated Cell Sorting*, FACS) durchgeführt. Die Zellen wurden entsprechend des angestrebten Versuchsziels kultiviert, zweimal mit sterilem 1 x PBS (pH 4,7 oder pH 7,0) gewaschen und in geeignete Reaktionsgefäße überführt, ggf. erfolgte eine Fixierung der Zellen in FACS-Fix-Lösung. Anschließend wurde Propidiumiodid (PI) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml (Sigma, Stocklösung 1 mg/ml in 1 x PBS) zugegeben. Die eigentliche FACS-Messung wurde am *BD LSRT Fortessa™ Cell Analyser* durchgeführt, wobei die Auswertung der Daten mit Hilfe der *BD FACSDiva™* Software erfolgte (BD Biosciences). Die Einstellungen des PI-positiven *Gates* wurden für jeden untersuchten Hefestamm mit entsprechenden Kontrollen gewählt, die den Legenden der entsprechenden Abbildungen entnommen werden können. Wenn nicht gesondert vermerkt, wurden sämtliche Proben in Triplikaten und mit jeweils 100.000 *Events* im gesetzten *Gate* gemessen.

2.8. Metabolitenextraktion

Zellen des sensitiven Hefestammes BY4742 wurden in JG-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert und anschließend mit 1.000 AU K1-Toxin (Endkonzentration) versetzt. Über eine Zeitspanne von 5 h wurden Proben entnommen und direkt in 60 % Methanol gequenchet ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Extraktion der Metabolite erfolgte in Triplikaten nach Sasidharan *et al.* (2012). Die ATP-Level wurden mit Hilfe des Lumineszenz-basierten *ATP Determination Kit* (Thermo Fisher), freies Glycerol wurde unter Verwendung des *Free Glycerol Assay Kit* (Abcam) bestimmt; die Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.9. Ionenaustauschchromatographie

Eine Ionenaustauschchromatographie kann zur Trennung von Stoffen bzw. Proteinen anhand ihrer Ladung genutzt werden. Das reife K1-Heterodimer besitzt einen isoelektrischen Punkt von ungefähr 4,34, so dass bei Verwendung eines McIlvaine-Puffers mit pH 4,0 (10 mM) als Chromatographie-Laufpuffer das Killertoxin positiv geladen vorliegt. Aus diesem Grund wurden vorgepackte, stark kationenaustauschende *HiTrap-Sulphopropyl-IEX*-Säule (17-1151-01, GE Healthcare Life Sciences™) mit fixierten negativen Ladungen und einer Ionenkapazität von 0,15 bis 0,20 mmol H^+ /ml zur Chromatographie genutzt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Anlegen eines Salzgradienten (0,1-1,0 M NaCl in 10 mM McIlvaine, pH 4,0). Die Durchführung erfolgte mit Hilfe des peristaltischen Pumpensystems *BioLogic LP System* (Bio-Rad), während die Daten mit Hilfe der *LP Data View* Software aufgezeichnet und ausgewertet wurden. Während der Elution wurden Fraktionen von je 1 ml gesammelt, gegebenenfalls gepoolt und dialysiert (10 mM McIlvaine, pH 4,7). Anschließend wurden die Fraktionen mittels *Vivaspin 6*-Zentrifugationseinheiten mit einer Ausschlussgrenze von 5 kDa (VS0612, Sartorius™) eingengt und im MBA-Diffusionstest untersucht.

2.10. Lipidomanalyse

Eine Lipidomanalyse der Stämme KIM01 und KIM01s wurde durch die Firma Lipotype GmbH (Dresden, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden Kulturen beider Stämme ü. N. in YPD angezogen ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) und anschließend über mehrere Tage in JG-Medium bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ subkultiviert. Die Hauptkultur wurde mit einer Start- OD_{600} von 0,1 angeimpft und bis zu

einer finalen OD von 0,5 bei 20 °C inkubiert. Die eigentlichen Proben zur Lipidomanalyse wurden nach Angaben des *Sample Preparation Guides* von Lipotype hergestellt. Zunächst wurden die Zellen pelletiert (3 min, 5.000 g, 4 °C) und zweimal mit H₂O_{steril} gewaschen. Im Anschluss wurde das Pellet zu einer OD₆₀₀ von 20 pro ml resuspendiert und die Zellen wurden nach Zugabe von Glasperlen mit Hilfe einer Schwingmühle für 10 min bei 4 °C aufgeschlossen. 500 µl des Zellysats wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

2.11. Transkriptomanalyse

2.11.1. Vorbereitung und experimentelles Design

Zur Adaptation des Metabolismus an die eigentlichen experimentellen Bedingungen wurden die entsprechenden Hefekulturen in mehreren Subkultivierungsschritten in JG-Medium bei 20 °C und 110 rpm kultiviert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei experimentelle Ansätze verfolgt; neben dem sensitiven Stamm BY4742 wurden die Killerstämme KIM01 und KIM01s mit K1-Toxin inkubiert. Das für diese Versuche verwendete K1-Toxinkonzentrat wurde in JG-Medium hergestellt, die Toxizität wurde zuvor mittels MBA gegen den sensitiven Hefestamm BY4742 getestet; für jede Versuchsreihe wurde eine Konzentration von 1.000 AU im entsprechenden Endvolumen gewählt.

2.11.2. RNA-Isolation

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde die Hauptkultur der jeweiligen Hefe mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und 9-12 h bei 20 °C und 110 rpm bis zu einer finalen OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. 10 ml der Zellsuspension wurden pelletiert (12.000 rpm, 5 min, 4 °C) und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die restliche Zellsuspension wurde mit K1-Toxin (1.000 AU Endkonzentration) versetzt und es wurden Proben zu distinkten Zeitpunkten (2, 10, 30, 60 und 120 min) entnommen; für jeden Zeitpunkt inklusive der Kontrolle wurden insgesamt drei technische Replikate angefertigt. Die gefrorenen Pellets wurden auf Trockeneis angetaut, in 1 ml Tri-Reagent (Sigma) resuspendiert und in frische Reaktionsgefäße überführt. Die Zellyse wurde mit Hilfe eines Homogenisators (*Precellys® Evolution*, Bertin Instruments) nach Zugabe von HCl-gereinigten Glasperlen durchgeführt (3 x 1 min Intervalle mit je 1 min Pause, Schüttelfrequenz 9.000 rpm). Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (1 min, 14.000 rpm, RT) und die Gesamt-RNA mit Hilfe

des *Direct-zol™ RNA Isolation Kits* (Zymo Research) isoliert; zusätzlich wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt, um eine Kontamination der Proben mit DNA zu vermeiden. Die Integrität der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und die RNA-Konzentration jeder Probe wurde mit Hilfe des *Qubit™ RNA HS Assay Kits* (Invitrogen) bestimmt; RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Das Poly-A *Enrichment* wurde über die Methode der mRNA-Isolation mit Hilfe des *NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Moduls* aus 1 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Die cDNA-Library-Präparation erfolgte unter Verwendung des *NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®*, wobei die Indexprimer der *NEBnext Multiplex Oligos* verwendet wurden (Set 1-4). Zur finalen Amplifikation der cDNA wurden acht PCR-Zyklen gewählt. Die Größenverteilung der *Libraries* wurde mit Hilfe des *Agilent Bioanalyser High Sensitivity DNA Chip* (Agilent) überprüft. Sämtliche Kits wurden nach Angaben des Herstellers verwendet; die Lagerung der cDNA-Banken erfolgte bei -20 °C.

2.11.3. Illumina-Sequenzierung

Die Sequenzierung der cDNA-Libraries mit Hilfe der Illumina-Technik wurde in Kooperation mit dem Lehrstuhl Genetik/Epigenetik von Prof. Jörn Walter (UdS) durchgeführt. Hierbei erfolgte die *Multiplex*-Sequenzierung in der Illumina HiSeq2500 im *High Output Mode* mit einer Read-Länge von 1 x 100 Nukleotiden. Im Anschluss wurden die Reads mit Hilfe des Programms *bcl2fastq* (v1.8.4, Illumina) *de-multiplexed* und in FASTQ-Files konvertiert. Nach Beseitigung von Kontaminationen mit dem Illumina TruSeq-Adapter AGATCGGAAGAGC und Basen mit geringer Qualität am 3'-Ende ($Q \leq 20$) mit Hilfe des Programms *Cutadapt wrapper* (v1.4.1) wurden die Adaptorsequenzen mit *TrimGalore* (v0.3.3) entfernt (Martin, 2011). Die Rohdaten wurden unter den *Accession*-Nummern PRJEB28672 (BY4742) bzw. PRJEB34586 (KIM01-KM01s) im *European Nucleotide Archive* (ENA) hinterlegt. Sämtliche Daten (TPM-Matrizen, *Read Counts*, *GO Enrichment* Input-Daten etc.) können zudem elektronisch am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie eingesehen werden.

2.11.4. Auswertung der Daten

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Marcel Schulz (Goethe Universität, Frankfurt; ehemals MPI, UdS). Hierzu wurde der Datensatz jedes Replikats für eine Quantifizierung der Genexpression mit Hilfe der Software *Salmon*

(v0.8.2) verwendet (Patro *et al.*, 2017). Differenziell exprimierte Gene (*Differentially Expressed Genes*, DEG) wurden mit der DESeq2-Methode unter Verwendung der durch *Salmon* erhaltenen *Read*-Anzahl und eines *Multiple Testing-corrected p*-Wertes ($p_{adjusted}$, $p_{adj.}$) bestimmt. Zur Visualisierung der Daten wurde ein *Gene Ontology* (GO) *Enrichment* mit Hilfe der *Gene Ontology Enrichment Analysis and Visualisation* (*Gorilla*) Software durchgeführt. Dieses Browser-basierte Programm vergleicht die gewünschten DEG-Sets mit einem auszuwählenden genetischen Hintergrund. Alle Auswertungen dieser Arbeit wurden vor dem Hintergrund des *S. cerevisiae*-Stammes S288C durchgeführt, dessen Genom vollständig annotiert vorliegt. Zudem handelt es sich hierbei um den parentalen Stamm der eingesetzten Hefe BY4742, so dass sich beide Hefen lediglich in einigen wenigen Stoffwechselgenen unterscheiden (Brachmann *et al.*, 1998). Die resultierende Liste an GO-Termen wurde basierend auf dem berechneten *False Discovery Rate* (FDR)-korrigierten q -Wert weiter mit der Software *Revigo* (*Reduce and Visualise Gene Ontology*) reduziert (*Small Similarity* [0,5] und *SimRel Score*).

Zur zeitabhängigen GO-Analyse der Datensätze wurden die DEG zusätzlich zu ihrem positiven oder negativem *log2-Fold Change* nach den jeweiligen Zeitclustern sortiert. Die Analyse erfolgte im Anschluss ebenfalls mittels *Gorilla*, die Datenreduktion der hochsignifikanten Terme ($FDR-q < 0,01$) wurde mit *Revigo* durchgeführt. Entsprechende Graphen wurde gemäß des \log_{10} p-Wertes (X-Achse) und des so genannten *Semantic Space* (Y-Achse), welcher die Ähnlichkeit der einzelnen Terme untereinander angibt, dargestellt; hierbei korrelierten die Größe und Farbe der dargestellten Sphären mit der Signifikanz der zugehörigen Terme (groß und dunkelblau: höchste Signifikanz).

2.11.5. DREM 2.0 Analyse

Der *Dynamic Regulatory Events Miner* (*DREM v2.0*) stellt eine Java-basierte Software dar, welche in der Lage ist, Genexpressions-Datensätze in Abhängigkeit der Zeit und einer potentiellen Transkriptionsfaktor-Regulation in einer dynamischen Darstellung abzubilden. Hierbei werden die Gene so gruppiert, dass eine Einteilung des Datensatzes in verschiedene biologische Prozesse möglich ist; gleichzeitig werden den unterschiedlichen Gabelungen Transkriptionsfaktoren (TF) zugeordnet, die wahrscheinlich für diese Aufspaltung verantwortlich sind. Zur Durchführung wurden die TPM-Werte der Triplikate jedes Gens für jeden Zeitpunkt gemittelt und diese Datenmatrix wurde als Input für die *DREM*-Software verwendet (*log normalise data*, *yeast_anyCond001*). Zusätzlich wurde das

Minimum der absoluten Expressionsänderung auf 0,3 gesetzt und eine Bonferroni-Korrektur für die GO-Analyse gewählt. Für die TF-Zuteilung wurde ein Schwellenwert von $p < 0,01$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

Das A/B-Toxin K1, das von Virus-infizierten Stämmen der Hefe *S. cerevisiae* sezerniert wird, übt seine letale Wirkung durch Ausbildung Kationen-selektiver Ionenkanäle aus. Diese Disruption der Plasmamembran führt in sensitiven Hefezellen zu einem Zusammenbruch des Protonentransmembrangradienten und letztendlich zum Zelltod. Obwohl das ionophore Toxin zu den am besten untersuchten Killertoxinen der Bäckerhefe zählt, konnten bis dato weder die molekularen Grundlagen des letalen Mechanismus noch die der intrinsischen Immunität aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte aus diesem Grund nicht nur die Wirkung des Killertoxins auf sensitive Zellen genauer charakterisiert, sondern auch die Vermittlung der funktionellen Immunität näher beleuchtet werden. Eine Mutationsanalyse der unterschiedlichen Toxinuntereinheiten sollte hierbei Aufschluss über die Beteiligung der strukturellen Komponenten an Toxizität bzw. Immunität geben. Mit Hilfe einer Transkriptomanalyse sollte außerdem die globale transkriptionelle Regulation sensitiver Zellen nach externer K1-Applikation untersucht werden, so dass Rückschlüsse auf potentielle zelluläre Abwehrmechanismen und den eigentlichen toxischen Effekt des Killertoxin möglich werden. Eine komparative Analyse zweier K1-Killerstämme mit distinkten phänotypischen Charakteristika sollte das co-adaptive Verhältnis von Wirtszellen und den Killerviren detaillierter darstellen, zudem sollten potentielle Effekte der Toxinsekretion auf die Killerzellen selbst beschrieben werden.

3.1. Charakterisierung der K1-Toxinaktivität

Die Charakterisierung von Killertoxinen wird oftmals durch ihr sehr spezifisches und enggefasstes pH-Optimum sowie ihre geringe Temperaturstabilität erschwert. Insbesondere die Aufreinigung der Toxine in einer ausreichend hohen Qualität und Menge, die zur Proteinkristallisation eingesetzt werden kann, war dadurch bislang eingeschränkt, wobei zudem oftmals ein Verlust der biologischen Aktivität verzeichnet werden kann. Für das K1-Toxin sind aus diesem Grund bis heute keine Strukturanalysen vorhanden, die essentielle Hinweise auf die *in vivo* Funktion unterschiedlicher Peptidsequenzen innerhalb des Heterodimers geben könnten. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Alexandra Kindelan Lohse („Optimierung der Kultivierungsbedingungen des viralen Killertoxins K1“) wurde daher der K1-sezernierende *S. cerevisiae*-Stamm T158c in verschiedenen Medien kultiviert.

Im Hinblick auf eine potentielle Eignung zur Kationenaustauschchromatographie wurden die resultierenden Toxinkonzentrate auf grundlegende Toxinaktivität sowie ihre Temperatur- und pH-Stabilität im MBA-Test untersucht. Die Reinheit der Toxinkonzentrate wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert, die Bildung potentieller Toxin-Agglomerate wurde weiterhin mit Hilfe von Western Analysen untersucht.

3.1.1. Toxinaktivität in Abhängigkeit des Kulturmediums

Die Produktion von *S. cerevisiae*-Killertoxinen wie K1 und K28 erfolgt standardmäßig in synthetischem B-Medium, welches erstmals von Heerde & Radler (1978) beschrieben wurde. Die klassische Zusammensetzung des Mediums wurde an die Produktion eines K28-Toxinkonzentrates angepasst, wobei auf die Zugabe von CaCl_2 verzichtet wurde (Pfeiffer & Radler, 1982); zusätzlich konnte eine Supplementation des Mediums mit Glycerol zur deutlichen Stabilisierung des Toxins beitragen. Neben diesem Medium wurde das ebenfalls synthetische Minimalmedium YNB-D-Brij58 auf seine Eignung zur K1-Produktion untersucht. Dieses Medium enthält neben einer definierten Mischung von Aminosäuren und Vitaminen (YNB, *Yeast Nitrogen Base*) lediglich Glucose und das anionische Detergens Brij58 und wurde bereits erfolgreich in Untersuchungen mit dem ebenfalls ionophoren Killertoxin PMKT der Hefe *Pichia membranifaciens* angewandt (Santos & Marquina, 2004). Im Unterschied zu diesen beiden synthetischen Medien wurde zur Produktion von K1-Toxinkonzentraten zudem das JG-Medium verwendet. Dieses Vollmedium enthält u. a. neben Glycerol zusätzlich Pepton und Hefeextrakt, welche ebenfalls die Stabilisation des Killertoxins begünstigen können (Flegelova *et al.*, 2002). Die hergestellten K1-Konzentrate wurden zunächst im MBA-Diffusionstest auf ihre basale Aktivität gegen den sensitiven Hefestamm BY4742 untersucht. Da es erfahrungsgemäß im Verlauf der diversen Reinigungsschritte zu Aktivitätsverlusten kommen kann, wurde anschließend die Restaktivität jedes Toxinkonzentrates in Abhängigkeit des eingesetzten Kulturmediums nach den jeweiligen Aufreinigungsschritten analysiert (**Abb. 5**).

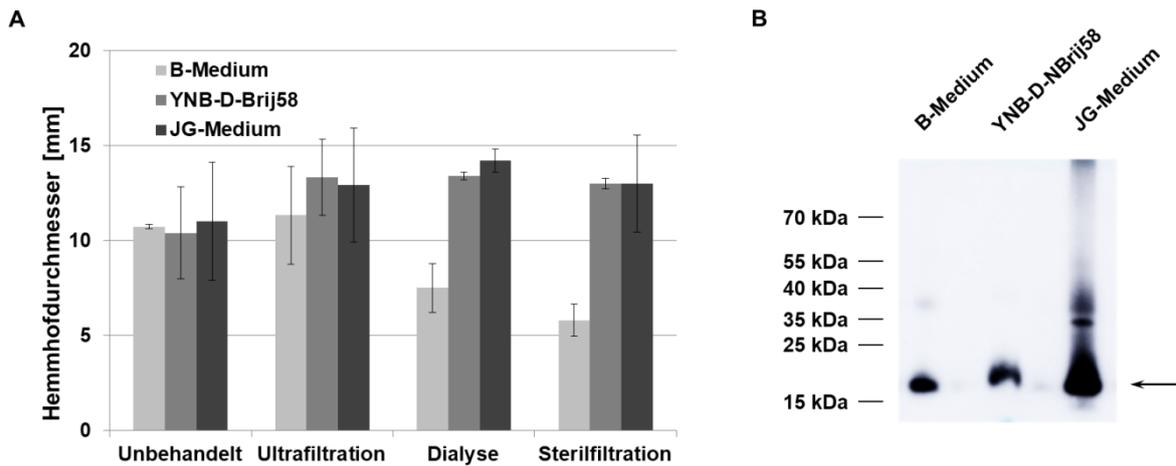


Abbildung 5: A Aktivität unterschiedlicher K1-Toxinkonzentrate in Abhängigkeit der verwendeten Kulturmedien. Der K1-sezernierende Killerstamm T158c wurde zunächst in YPD angezogen und anschließend zur Toxinproduktion in unterschiedlichen Kulturmedien (B-Medium, YNB-D-Brij58, JG-Medium) über 5 d bei 20 °C inkubiert. Die Aktivität der Toxinkonzentrate nach den entsprechenden Aufreinigungsschritten wurde mittels MBA-Diffusionstest (SC-MBA-Glucose, pH 4,7) gegen den sensitiven Stamm BY4742 untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert des Hemmhofdurchmessers [mm ± Stabw] der unbehandelten Hauptkultur (Unbehandelt), nach Konzentrierung in der Amicon-Filtrationseinheit (Ultrafiltration) und nach Dialyse bzw. nach Sterilfiltration (n = 3). **B Qualitativer Nachweis der K1-Sekretion mittels Western Blot.** 5 ml der Toxinkonzentrate wurden nach Amicon-Filtration mittels TCA-Fällung präzipitiert. Nach Resuspension der resultierenden Pellets in nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer und SDS-PAGE wurden die Proteine auf PFDV-Membranen immobilisiert. Die Immunodetektion erfolgte mit Hilfe eines spezifischen α -K1-Antikörpers (1:1.000), die Laufhöhe des K1-Heterodimers (ca. 18 kDa) ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Untersuchung der K1-Aktivität in Abhängigkeit des jeweiligen Kulturmediums zeigte, dass sich alle verwendeten Medien generell zur Toxinproduktion eignen, allerdings die Stabilität des Toxins in unterschiedlicher Weise unterstützen (**Abb. 5A**). Besonders nach Dialyse der Toxinkonzentrate konnte ein deutlicher Verlust der K1-Toxinaktivität im B-Medium detektiert werden, welcher sich durch die darauffolgende Sterilfiltration nochmals verstärkte. Erfolgte die Toxinproduktion in JG- bzw. YNB-D-Brij58-Medium konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust der entsprechenden Toxinkonzentrate im Verlauf des Reinigungsprozesses detektiert werden. Die verschiedenen K1-Konzentrate wurden weiterhin mit Hilfe einer Western Analyse unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf den generellen K1-Gehalt sowie potentielle Agglomerate untersucht. Für alle verwendeten Kulturmedien konnte eine Toxin-spezifische Bande auf einer Höhe von ungefähr 18 kDa detektiert werden (**Abb. 5B**). Für das K1-Toxin, welches im JG-Medium hergestellt wurde, konnte eine weitere deutlich Bande bei ungefähr 35 kDa festgestellt werden, welche entweder höhermolekulare K1-Aggregate oder nicht prozessierte K1-Precursor-Moleküle, die während der Herstellung des Toxinkonzentrates durch Lyse der Killerzellen freigesetzt wurden, darstellt. Weiterhin zeigten die Proben des Toxins im B- und JG-Medium eine

diffuse Bande auf einer Höhe von ungefähr 38 kDa. Potentielle Verunreinigungen der verschiedenen K1-Konzentrate durch Bestandteile des jeweiligen Mediums wurden mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten SDS-Gels untersucht (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden Aliquots analog zur Western Analyse zunächst TCA-präzipitiert und anschließend in nicht-reduzierendem Probenpuffer resuspendiert. Die Coomassie-Färbung zeigte deutliche Protein-verunreinigungen durch das zugesetzte Pepton sowie den Hefeextrakt für das K1-Toxin im JG-Medium, welche größtenteils weder durch eine Ultrafiltration noch durch eine Dialyse entfernt werden konnten. Die Probe des K1-Toxins im B-Medium zeigte zwar keine signifikanten Verunreinigungen, allerdings konnte durch die Färbung lediglich eine sehr schwache Bande sichtbar gemacht werden, was mit den Ergebnissen der MBA-Diffusionstests sowie der Western Analyse korreliert. Für das K1-Toxin im YNB-D-Brij58-Medium konnten ebenfalls keine deutlichen Proteinverunreinigungen festgestellt werden, allerdings zeigten die Ergebnisse des Western Blots und des Coomassie-Gels, dass das enthaltene Detergens nicht durch die zuvor durchgeführten Aufreinigungsschritte entfernt werden konnte und zu teilweise deutlichen Laufverzögerungen während der SDS-PAGE führte. Zur Unterscheidung potentieller cytotoxischer bzw. lytischer Effekte des Detergens im konzentrierten Toxin und der ionophoren Wirkung des Killertoxins wurde ein MBA-Test mit dem immunen K1-Killerstamm T158c durchgeführt (Daten nicht gezeigt); hierbei konnte keine Ausbildung einer Hemmhofzone beobachtet werden, so dass die beobachtete toxische Wirkung des Toxinkonzentrates vollständig auf das enthaltene K1-Toxin zurückgeführt werden kann.

3.1.2. Temperatur- und pH-Stabilität des K1-Toxins

K1 besitzt wie die meisten Killertoxine ein Temperaturoptimum von 20 °C und pH-Optimum im leicht sauren Bereich von pH 4,7. Vorhergehende Arbeiten konnten zeigen, dass eine temperaturabhängige Inaktivierung des Toxins bereits nach 20 minütiger Inkubation bei 37 °C eintritt, die durch eine Zugabe von 10 % Glycerol minimal verzögert werden kann (Sehn, 2005). Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern sich die Verwendung der verschiedenen Kulturmedien auf die Temperaturstabilität des K1-Toxins bei 30 °C und 37 °C auswirkt. Hierzu wurden Aliquots sterilfiltrierter und dialysierter Toxinkonzentrate bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert und Proben über einen

Zeitraum von fünf Stunden entnommen; diese wurden im MBA-Test auf ihre verbleibende Toxinaktivität gegen den sensitiven Stamm BY4742 untersucht (**Abb. 6**).

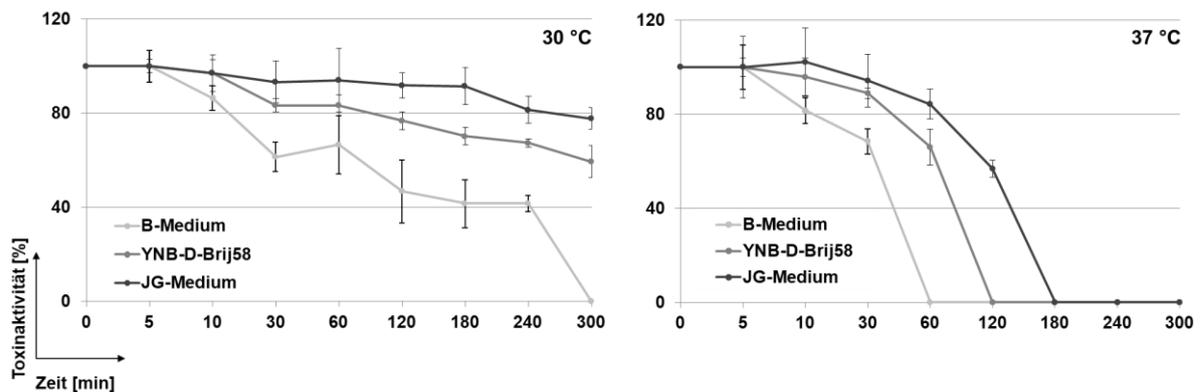


Abbildung 6: Temperaturstabilität des K1-Toxins in Abhängigkeit vom eingesetzten Kulturmedium. Zur Untersuchung der Toxinstabilität wurden Aliquots von dialysierten und sterilfiltrierten Toxinkonzentraten (B-Medium, YNB-D-Brij58, JG-Medium) über 5 h bei 30 °C (**links**) bzw. 37 °C (**rechts**) inkubiert; es wurden Proben nach 5, 10, 30, 60, 120, 180, 240 und 300 min entnommen und im MBA-Test (SC-MBA-Glucose, pH 4,7) gegen den sensitiven Stamm BY4742 auf Toxinaktivität getestet. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen der sensitiven Hefe in den Agar eingebettet und 100 μ l der unverdünnten Toxinkonzentrate in vorgestanzte Löcher pipettiert. Nach 2-3 d Inkubation (20 °C) wurde der Durchmesser des Hemmhofes bestimmt. Dargestellt ist die Toxinaktivität [% \pm Stabw] nach Normierung auf die entsprechende Kontrolle (0 min, 100 %), (n = 5).

Nach einer Inkubation bei 30 °C wurde der deutlichste Toxizitätsverlust des K1-Toxins im B-Medium beobachtet (**Abb. 6, links**). Während das Toxin in JG-Medium deutlich stabilisiert wurde und der maximale Aktivitätsverlust nach fünf Stunden lediglich bei 20 % lag, verlor K1 im YNB-D-Brij58 stetig an Aktivität, so dass eine Restaktivität von ca. 50 % am Ende der Versuchsreihe detektiert werden konnte. Die Halbwertszeit der Toxinaktivität von K1 im B-Medium wurde bereits nach 30 min bei 30 °C erreicht, nach fünf Stunden konnte keine Toxinaktivität mehr nachgewiesen werden. Bei einer Inkubation der Toxinkonzentrate bei 37 °C trat bereits nach 60 min ein vollständiger Aktivitätsverlust im Fall des B-Mediums ein (**Abb. 6, rechts**). Sowohl das YNB-D-Brij58- als auch das JG-Medium waren in der Lage, K1-Konzentrate über einen vergleichsweise längeren Zeitraum zu stabilisieren; nach zwei Stunden konnte für das Toxinkonzentrat im YNB-D-Brij58-Medium keine Aktivität mehr festgestellt werden. Ähnlich einer Inkubation bei 30 °C stabilisierte das JG-Medium das K1-Toxin am deutlichsten, so dass erst nach drei Stunden ein vollständiger Verlust der Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Neben der Temperaturstabilität in Abhängigkeit des verwendeten Kulturmediums wurde zusätzlich auch die Sensitivität der Toxinkonzentrate hinsichtlich einer Änderung des extrazellulären pH-Wertes untersucht. Hierzu wurden Aliquots der K1-Konzentrate gegen 10 mM McIlvaine-Puffer unterschiedlicher pH-Werte von 3,0 bis 8,0 dialysiert und die Toxinaktivität im MBA-Test gegen den sensitiven Stamm BY4742 überprüft (**Abb. 7**).

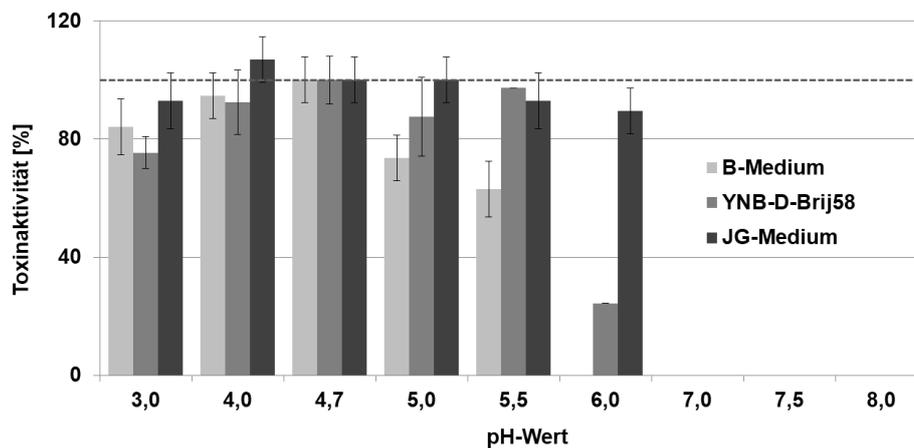


Abbildung 7: Einfluss des Kulturmediums auf die pH-Stabilität des K1-Toxins. Aliquots der K1-Toxinkonzentrate in den entsprechenden Kulturmedien (B-Medium, YNB-D-Brij58, JG-Medium) wurden 24 h bei 4 °C gegen McIlvaine-Puffer (10 mM) dialysiert (pH-Werte von 3,0-8,0). Die Toxinaktivität wurde anschließend im MBA-Diffusionstest (SC-MBA Glucose, pH 4,7) bestimmt. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen der sensitiven Hefe BY4742 in den Agar eingebettet und 100 μ l der unverdünnten Toxinkonzentrate in vorgestanzte Löcher appliziert. Der Durchmesser des Hemmhofes wurde nach Inkubation (2-3 d, 20 °C) ausgemessen. Dargestellt ist die Toxinaktivität [% \pm Stabw] nach Normierung auf die entsprechende Kontrolle (0 min, 100 %, graue Linie), (n = 5).

Die Auswertung der Agar-Diffusionstests zeigte, dass eine Ansäuerung des extrazellulären pH-Wertes die Killeraktivität von K1 nur minimal reduziert, während eine Verschiebung des pH-Wertes ins Basische die Aktivität deutlich verringert (**Abb. 7**). Im pH-Bereich von 3,0 bis 4,7 konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Kulturmedien in Bezug auf die Stabilisierung des Killertoxins beobachtet werden; lediglich bei pH 3,0 verringerte sich die Killeraktivität im B- und YNB-D-Brij58-Medium auf ca. 80 %. Die höchste pH-Stabilität konnte durch Verwendung des JG-Mediums erreicht werden, so dass auch bei einem pH-Wert von 6,0 eine Restaktivität von 80 % verzeichnet werden konnte. Toxinkonzentrate im B-Medium verloren hingegen bei zunehmendem extrazellulären pH-Wert konstant an Aktivität; ab einem pH-Wert von 5,5 konnte keine Toxinaktivität mehr festgestellt werden. K1-Toxin im YNB-D-Brij58-Medium zeigte eine relativ konstante Aktivität auch in pH-Bereichen von 5,0 bis 5,5. Eine signifikante Abnahme bis zu einer Restaktivität von ca. 30 % konnte bei einem pH-Wert von 6,0 beobachtet werden. Ab einem neutralen pH-Wert

von 7,0 konnte keines der verwendeten Kulturmedien das Killertoxin so stabilisieren, dass eine Restaktivität im MBA-Test nachgewiesen werden konnte.

Die Untersuchung der K1-Toxinaktivität in Abhängigkeit des jeweils verwendeten Mediums zeigte deutliche Unterschiede hinsichtlich Reinheit bzw. pH- und Temperaturstabilität der jeweiligen Toxinkonzentrate. Bei Kultivierung des K1-Killerstammes T158c im klassischen B-Medium wurde lediglich eine moderate Toxinmenge produziert. Zusätzlich zu relativ hohen Verlusten der Toxinaktivität während der Toxinproduktion wurde das K1-Toxin zudem nicht signifikant vor pH- und Temperaturschwankungen geschützt. Im Unterschied hierzu zeigte sich bei Verwendung von YNB-D-Brij58-Medium neben einer deutlichen Steigerung der Toxinausbeute auch eine signifikant höhere Restaktivität bei Inkubation der K1-Konzentrate außerhalb des eigentlichen Temperatur- und pH-Optimums. Die höchste Stabilisierung des Killertoxins konnte in JG-Medium verzeichnet werden, welches allerdings aufgrund des zugesetzten Peptons und Hefeextraktes ebenfalls die deutlichsten Verunreinigungen mit Fremdproteinen aufwies. Da sowohl das B-Medium als auch das YNB-D-Brij58-Medium synthetische Medien mit genau kontrollierter Zusammensetzung sind, wurde für beide eine sehr geringe Kontamination des Toxinkonzentrates mit anderen sezernierten Proteinen festgestellt.

Basierend auf den Ergebnissen wurde im Folgenden zur Durchführung der Ionenaustauschchromatographie K1-Toxin in YNB-D-Brij58-Medium produziert, da das vorhandene Detergens den Versuchsablauf nicht beeinflusste und der Proteinhintergrund möglichst gering gehalten werden sollte. Sobald der Fokus auf einer möglichst hohen Stabilität des K1-Toxins über einen längeren Zeitpunkt lag, wurde Toxinkonzentrat in JG-Medium verwendet.

3.1.3. Kationenaustauschchromatographie

Der Bildung von Kationen-selektiven Poren durch die α -Untereinheit des K1-Killertoxins konnte bisher lediglich an artifiziellen Liposomen experimentell nachgewiesen werden und wird von Computer-basierten Strukturvorhersagen unterstützt (Martinac *et al.*, 1990). Eine Analyse der Kristallstruktur des Toxins könnte nicht nur zur Verifizierung dieses Modells beitragen, sondern auch weiterführende Untersuchungen deutlich vereinfachen. Hierzu ist eine qualitativ hochwertige Anreicherung von K1-Heterodimeren notwendig, die möglichst frei von Verunreinigungen durch Fremdproteine sind. Basierend auf vorangegangenen

Untersuchungen zur Toxinstabilität und -reinheit wurde dialysiertes K1-Toxinkonzentrat in YNB-D-Brij58-Medium hergestellt und zur Ionenaustauschchromatographie eingesetzt. Die durchgeführten Chromatographie-Durchläufe erfolgten unter Verwendung von 10 mM McIlvaine-Puffer mit einem pH von 4,0 bei Raumtemperatur. Da der berechnete isoelektrische Punkt des K1-Toxins bei einem pH-Wert von ca. 4,34 liegt, wurde von einer leicht positiven Ladung des Proteins ausgegangen und es wurden entsprechend stark kationenaustauschende Sulphopropyl-Säulen mit einem Bettvolumen von 1 ml genutzt. Nach Äquilibration der Säule mit Laufpuffer wurde eine geeignete Menge des Toxins in das verwendete Flusssystem eingebracht. Die Elution gebundener Proteine erfolgte per Verdrängungsprinzip durch das Anlegen eines Natriumchlorid-Gradienten (**Abb. 8**).

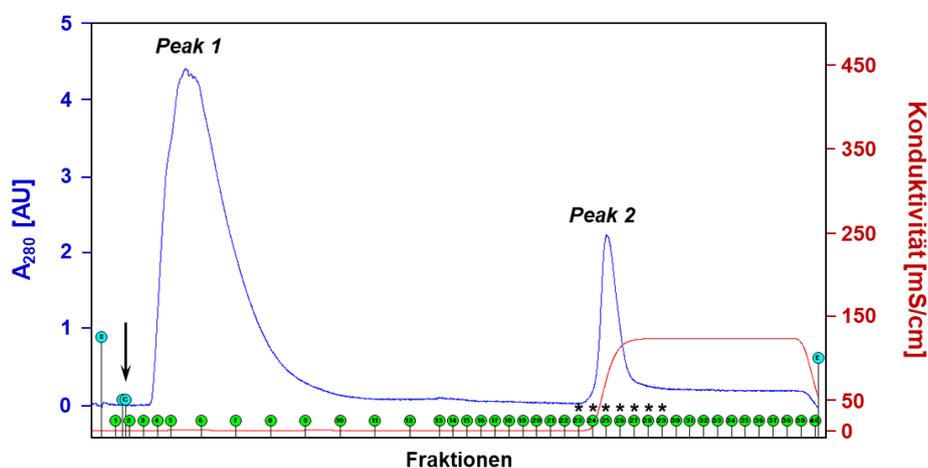


Abbildung 8: Elutionsprofil der Kationenaustauschchromatographie des Killertoxin K1. K1-Toxinkonzentrat im YNB-D-Brij58-Medium wurde eingengt und dialysiert. Die verwendete Sulphopropyl-Säule wurde zunächst mit Laufpuffer (10 mM McIlvaine, pH 4,0) äquilibriert. Der Zeitpunkt der Toxinzugabe ist mit einem schwarzen Pfeil verdeutlicht. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde ein NaCl-Gradient durch lineare Erhöhung der Menge des Elutionspuffers (10 mM McIlvaine mit 1 M NaCl, pH 4,0) angelegt. Die gesammelten Fraktionen der eluierten Proteine sind mit (*) gekennzeichnet. Die Absorption (gemessen bei 280 nm, A_{280} , blau) [Arbitrary Units, AU] sowie die Konduktivität [mS/cm] (rot) der mobilen Phase wurden konstant aufgezeichnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Elutionsprofil ($n = 2$).

Insgesamt wurden zwei distinkte *Peaks* nach Zugabe des K1-Toxins in das Chromatographie-System detektiert (**Abb. 8**). Während ersterer die Proteinfraction repräsentierte, die nicht an die Säule gebunden hat (*Peak 1, Durchlaufpeak*), zeigte der zweite wesentlich geringere *Peak* die durch das Anlegen des Natriumchlorid-Gradienten eluierten Proteine (*Peak 2*). Zur Analyse, ob das K1-Toxin an die Säule gebunden hatte und ohne Verlust der biologischen Aktivität wieder eluiert werden konnte, wurden die gesammelten Fraktionen des zweiten *Peaks* vereint, dialysiert (10 mM McIlvaine-Puffer, pH 4,7) und mittels *Vivaspin*-Zentrifugationseinheiten mit einer Ausschlussgrenze von

5 kDa eingengt. Mit Hilfe eines MBA-Diffusionstests gegen den sensitiven *S. cerevisiae*-Stamm 192.2d konnte durch die Ausbildung eines Hemmhofs gezeigt werden, dass biologisch aktives K1-Toxin in den gesammelten Fraktionen vorhanden war. Zudem wurden Fraktionen der nicht-gebundenen Proteine (*Peak 1*) zusammengeführt und auf Killeraktivität untersucht; hierbei wurde ebenfalls ein distinkter Hemmhof dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Proteinmenge in beiden gepoolten Proben reichte nicht aus, um distinkte K1-spezifische Banden mit Hilfe eines Coomassie-gefärbten Gels sichtbar zu machen. Die Ergebnisse der Kationenaustauschchromatographie machten jedoch deutlich, dass diese Methode prinzipiell zur Aufreinigung von biologisch aktivem K1-Toxin geeignet ist. Allerdings hatte ein Großteil des applizierten K1-Toxins nicht an die Säule gebunden, so dass weitere Optimierungen notwendig sind.

3.1.4. Charakterisierung des K1-Wirkungsspektrums

Im Folgenden sollte das Wirkungsspektrum der beiden Killertoxine K1 und Zygotin, einem ebenfalls ionophor-wirkenden Toxin der Schadhefe *Zygosaccharomyces bailii*, vergleichend analysiert werden. Für das monomere Killertoxin Zygotin konnte bereits ein sehr breites Wirkungsspektrum nachgewiesen werden, welches auch fakultativ humanpathogene Hefen wie beispielsweise *Candida albicans* einschließt (Weiler & Schmitt, 2003) Zur Untersuchung der Sensitivität unterschiedlicher Hefestämme bzw. -gattungen wurden diese entsprechend in Komplex-Methylenblau-Agar eingebettet und 100 µl eines K1-Toxinkonzentrates (2.000 AU) wurden extrazellulär appliziert (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Wirkungsspektrum des ionophoren Killertoxins K1. Stämme verschiedener Hefegattungen wurden im Komplex-MBA (Glucose, pH 4,7) auf ihre Sensitivität gegen das Killertoxins K1 untersucht (2.000 AU). Dargestellt ist der mittlere Hemmhofdurchmesser [mm] (n = 5). PI: Patientenisolat-Nummer, NCYC: National Collection of Yeast Cultures (UK).

GATTUNG	STAMM/ HERKUNFT	HEMMHOF Ø [mm]	GATTUNG	STAMM/ HERKUNFT	HEMMHOF Ø [mm]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	192.2d	20	<i>Candida albicans</i>	PI 576394	6
	BY4741	22		PI 529963	2
	BY4742	20		PI 577834	5
	s86c	22		PI 572983	4
	SEY2102	17		PI 573218	2
	SEY6210	17		PI 577834	5
	SEY6211	14		PI 591229	9
<i>Pichia pastoris</i>	GS115	0		PI 591472	2
	KM71	0		PI 591723	6
<i>Candida glabrata</i>	NCYC 388	18		PI 591229	6
	499	10		NCYC 3115	6
	NCYC 3519	15		NCYC 3520	8
<i>Candida krusei</i>	185	0		NCYC 3527	6
<i>Candida vini</i>	6914a	0	NCYC 3778	6	
<i>Pichia jadinii</i>	251	0	NCYC 3779	6	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	187	0			

Besonders im Hinblick auf eine potentielle Verwendung von K1-Toxin in medizinischen oder agrikulturnen Anwendungsgebieten stellt eine genaue Charakterisierung des Wirkungsspektrums und der Fähigkeit des Toxins zur Abtötung von humanpathogenen Hefegattungen, einen wichtigen Aspekt dar. Zusätzlich kann das Wirkungsspektrum eines Killertoxins Rückschlüsse auf mögliche mechanistische Besonderheiten des Toxins geben. Im direkten Vergleich zu Zygocin konnte für K1 ein deutlich enger gefasstes Wirkungsspektrum beobachtet werden, wobei die deutlichste toxische Wirkung vor allem für *S. cerevisiae*-Stämme beobachtet wurde (**Tabelle 10**). Weiterhin wurden auch die analysierten *C. glabrata*-Isolate durch die Applikation von K1-Toxin deutlich in ihrem Wachstum gehemmt. Im Fall der fakultativ humanpathogenen Hefe *C. albicans* konnte für alle untersuchten Isolate die Ausbildung einer Hemmzone beobachtet werden, welche allerdings im Vergleich zu *C. glabrata* deutlich geringer ausfiel. Hefen der Gattungen *C. krusei*, *C. vini*, *P. jadinii*, *Z. rouxii* sowie die *P. pastoris*-Stämme GS115 und KM71 zeigten keinerlei Sensitivität gegenüber dem applizierten K1-Toxin.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten zwar daraufhin, dass K1 ein relativ breites Wirkungsspektrum besitzt und in der Lage ist, Hefen unterschiedlicher Gattungen abzutöten, allerdings das Spektrum der letalen Wirkung im Vergleich zum monomeren Killertoxin Zygocin deutlich geringer ausgebildet ist.

3.1.5. Analyse der *in vivo* Abtötungskinetik von des K1-Toxins

Zur näheren Charakterisierung der zeitlichen Wirkung des Killertoxins wurden Untersuchungen zur Porenbildung in der Plasmamembran sensibler Zellen mit der tatsächlichen Abnahme der Zellvitalität korreliert. Der porenbildende Effekt des verwendeten K1-Konzentrats wurde zunächst qualitativ mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurden Zellen des sensitiven Stammes BY4742 mit 1.000 AU Toxinkonzentrat (JG-Medium) über einen Zeitraum von zwei Stunden inkubiert und mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) versetzt; Hitze-inaktiviertes Toxin diente hierbei als Kontrolle. Durch die Verwendung von relativ hohen Toxinkonzentrationen sollte die Induktion einer Apoptosereaktion der Zielzelle verhindert werden (Reiter *et al.*, 2005). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Porenbildung zeigte ca. 80 min. nach K1-Applikation eine deutliche Anzahl PI-positiver Zellen, die vollständig auf die ionophore Wirkung des Killertoxins zurückzuführen ist. Eine Inaktivierung des K1-Proteins durch starkes Erhitzen führte nicht nur zu einem kompletten Verlust der Toxizität, sondern auch zu keiner nachweisbaren PI-Fluoreszenz (Gier *et al.*, 2019a). Zur quantitativen Korrelation der Abnahme der Lebendzellzahl und dem ersten Auftreten von PI-detektierbaren Poren wurden Zellen des Hefestamms BY4742 mit 1.000 AU K1-Toxin inkubiert (20 °C, 100 rpm) und Proben über einen Zeitraum von fünf Stunden entnommen. Aliquots wurden zur Bestimmung der Lebendzellzahl in angemessenen Verdünnungen und in entsprechenden Replikaten auf YPD-Agarplatten ausplattiert. Analog wurden Proben mit 1 x PBS (pH 7,4) zur Inaktivierung von verbleibendem K1-Toxin gewaschen, mit FACS-Fix-Lösung fixiert und mit PI in einer Konzentration von 1 µg/ml versetzt. Die Quantifizierung der PI-positiven Zellen wurde mittels FACS-Analyse durchgeführt. Die Einstellung des *Gates* wurden hierbei unter Verwendung von Hitze-behandelten Hefezellen sowie ungefärbten Zellen durchgeführt (**Abb. 9**).

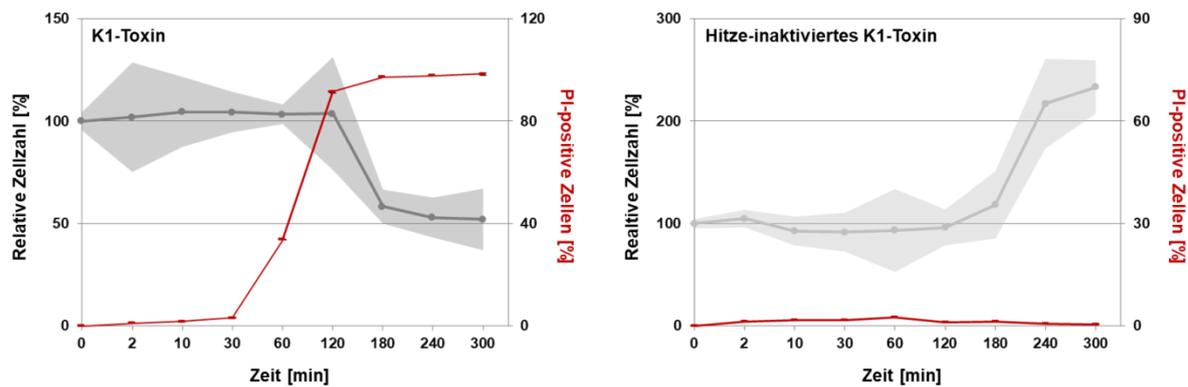


Abbildung 9: Zeitabhängige Korrelation der Lebendzellzahl und der K1-induzierten Porenbildung. Zellen des sensitiven Stammes BY4742 wurden bis zu einer OD_{600} von 0,5 in JG-Medium kultiviert (20 °C, 110 rpm) und anschließend mit 1.000 AU K1-Toxin versetzt (**links**). Proben für die Bestimmung der Lebendzellzahl (grau) bzw. der Anzahl PI-positiver Zellen (rot) wurden zeitgleich über einen Zeitraum von 5 h entnommen; als Kontrolle dienten Ansätze mit Hitze-inaktiviertem K1-Toxin (15 min, 100 °C), (**rechts**). Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden Aliquots mit 1 x PBS gewaschen und in verschiedenen Verdünnungen in mehreren Replikaten pro Probe auf YPD-Agarplatten ausplattiert; Kolonien wurden nach Inkubation für 3 d bei 30 °C ausgezählt. Dargestellt ist die relative Zellzahl [% ± Stabw] normiert auf die entsprechende Zellzahl der Kontrolle (Zellen vor Toxinzugabe). Die Porenbildung wurde mittels FACS-Analyse quantifiziert. Hierzu wurden Aliquots in 1 x PBS gewaschen, in FACS-Fix resuspendiert und mit 1 µg/ml PI-Lösung versetzt. Dargestellt ist die relative Anzahl PI-positiver Zellen [% ± Stabw] nach Normierung auf die entsprechende Kontrolle (kein Toxin); für jede Probe wurden jeweils Triplikate à 100.000 Events im entsprechenden *Gate* gemessen (verändert nach Gier *et al.*, 2019a).

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnten erste PI-positive Zellen bereits ca. 30 min nach K1-Applikation detektiert werden. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen stieg stetig und linear über einen Zeitraum von zwei Stunden an, so dass nach 120 min alle Zellen als PI-positiv identifiziert werden konnten; simultan konnte eine signifikante Abnahme der Lebendzellzahl erst nach ca. zwei Stunden detektiert werden (**Abb. 9, links**). Die Verwendung von Hitze-inaktiviertem Toxin konnte verdeutlichen, dass der verwendete Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid auch nach längerer Inkubation nicht membrangängig ist und die Detektion positiver Zellen auf einer Toxin-induzierten Desintegration der Plasmamembran beruht (**Abb. 9, rechts**). Im Unterschied zu biologisch aktivem K1 führte die Inkubation mit Hitze-inaktiviertem Toxin zu keiner Inhibierung des Zellwachstums bzw. nicht zum Absterben der sensitiven Zellen.

Die Untersuchungen hinsichtlich der K1-induzierten Porenbildung in sensitiven Zellen reproduzierte die bereits beschriebene *Lag*-Phase, die nach Toxin-Applikation beobachtet werden kann (Bussey, 1991; Skipper & Bussey, 1977). Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass die Disruption der Plasmamembran und eine Reduktion der Zellvitalität nicht linear korreliert werden kann, da die Detektion von ersten PI-positiven Zellen deutlich vor einer Verringerung der Lebendzellzahl beobachtet werden kann.

3.2. Effekte von Mutationen der K1-Untereinheiten auf Immunität und Toxizität

Ein genomweites Mutanten-Screening, welches die verfügbaren Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* auf ihre Sensitivität gegenüber extern appliziertem K1-Toxin analysierte, lieferte bereits wichtige Hinweise auf mögliche zelluläre Angriffspunkte des Toxins (Pagé *et al.*, 2003). Allerdings wird durch pleiotrope Effekte vieler Gendeletionen eine Interpretation des beobachteten Phänotyps oftmals erschwert. Im Fall einer externen Applikation des K1-Toxins spielt dies vor allem eine Rolle sobald eine Gendeletion eine direkte oder indirekte Auswirkung auf die Zellwandzusammensetzung hat. Besonders eine Veränderung des Gehalts an β -1,6-Glucan, welches als Primärrezeptor für das K1-Toxin fungiert, kann eine Veränderung der Toxinsensitivität der entsprechenden Mutante bedingen. Auf diese Weise kann nicht unterschieden werden, ob der beobachtete Effekt eine direkte Auswirkung der Mutation ist oder ob es sich um einen Sekundäreffekt handelt. Eine Möglichkeit die Zellwand zu umgehen, stellt eine Expression von K1-Derivaten direkt in den Hefemutanten dar, so dass von einer extrazellulären Applikation des Toxins abgesehen werden kann. Da die intrazelluläre Plasmid-getriebene Expression des K1-Vorläufers gleichzeitig zur Ausbildung einer vollständigen funktionellen Immunität ausreicht, kann dieses System zudem genutzt werden, um Auswirkungen unterschiedlicher Mutationen des Precursors auf die Vermittlung der intrinsischen Immunität zu untersuchen; so können funktionelle Bereiche des Precursors definiert werden, die essentiell für die toxische Wirkung bzw. die Toxinsekretion sind. Im Folgenden wurden daher gezielt Aminosäuren in bestimmten Bereichen des Vorläuferproteins bzw. ganze Untereinheiten substituiert und potentiell resultierende Einflüsse auf Immunität und Toxizität wurden mittels MBA-Diffusionstest überprüft. Im Fall der Toxizität wurden sensitive Zellen des Hefestammes BY4742 entweder als intakte oder als sphäroplastierte, und somit zellwandfreie, Zellen in entsprechend geeigneten MBA eingebettet. Im Anschluss wurden Kolonien der Transformanten auf den Agar aufgetropft. Für die Untersuchung der Immunität wurden die Transformanten zur Induktion der Expression in Galactose-haltigen MBA eingebettet und es erfolgte eine externe Applikation eines K1-Toxinkonzentrates (**Abb. 4**, schematische Darstellung der Durchführung). Die beobachteten Phänotypen wurden anhand der Eigenschaften der Kontrollen (WT-pptox bzw. Leervektor) klassifiziert (**Abb. 10**).

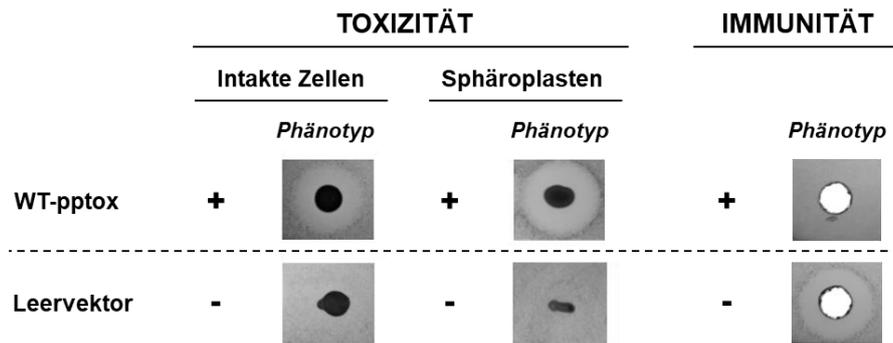


Abbildung 10: Expression des wildtypischen K1-Vorläufers führt zur Sekretion von biologisch aktivem Toxin und zur Ausbildung einer funktionellen Immunität gegen extrazellulär appliziertes Toxin. Wildtypisches K1-pptox und der Leervektor pYES2.1 wurden in sensitive Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes BY4742 transformiert. Toxinsekretion und -aktivität wurden mittels MBA-Diffusionstest gegen intakte Zellen sowie sphäroplastierte Zellen analysiert. Die biologische Aktivität wird durch die Ausbildung einer Hemmzone gekennzeichnet (+). Die Ausbildung von funktioneller Immunität wurde ebenfalls im MBA-Test untersucht. Hierzu wurden transformierte Zellen in den Agar eingebettet und K1-Toxinkonzentrat (1.000 AU) wurde extern appliziert. Der Verlust (-) bzw. die Ausbildung von Immunität (+) wird durch die entsprechende Ausbildung von Hemmhöfen visualisiert (verändert nach Gier *et al.*, 2019b).

Die Sekretion von biologisch aktivem Toxin konnte hierbei durch die Ausbildung eines Hemmhofs sowohl gegen intakte Zellen als auch Sphäroplasten gezeigt werden (WT-pptox, +). Die Ausbildung der intrinsischen Immunität ist hingegen durch ein ungestörtes Wachstums der Zellen nach Zugabe von extrazellulärem Toxin gekennzeichnet (wildtypischer Phänotyp, +), (**Abb. 10**). Wurden Transformanten aufgetropft, die kein Toxin bzw. keine biologisch aktive Toxinvariante sezernierten, konnte keine Bildung von Hemmzonen detektiert werden (Leervektor, -). Im Fall der Immunitätsvermittlung konnte in diesem Fall die Ausbildung eines deutlichen Hemmhofs beobachtet werden, der auf einen Verlust der intrinsischen Immunität hindeutet (-).

3.2.1. Intrazelluläre Expression von wildtypischen K1-Derivaten

Im Rahmen der Bachelorarbeit von Sabrina Lörcher („Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Toxinimmunität in Hefe mit Hilfe von K1-pptox und K1- α -Letalkonstrukten“) wurden nicht-mutierte wildtypische K1-Derivate hinsichtlich ihres induzierten Phänotyps nach intrazellulärer Expression untersucht. Neben dem K1-Vorläuferprotein (K1-pptox) und einer verkürzten Variante ohne Präpro-Region (K1-tox) wurden so genannte Letalkonstrukte mittels PCR hergestellt, welche lediglich die toxische α -Untereinheit enthalten. Nach Transformation in den sensitiven Hefestamm *S. cerevisiae* BY4742 und Durchführung eines seriellen Verdünnungstests konnte für kein Derivat eine

Verminderung des Wachstums der Transformanten unter nicht-induzierten Bedingungen (Glucose) festgestellt werden, wohingegen nach Induktion der Expression (Galactose) deutliche toxische Effekte im Fall der Letalkonstrukte beobachtet werden konnten (**Abb. 11**).

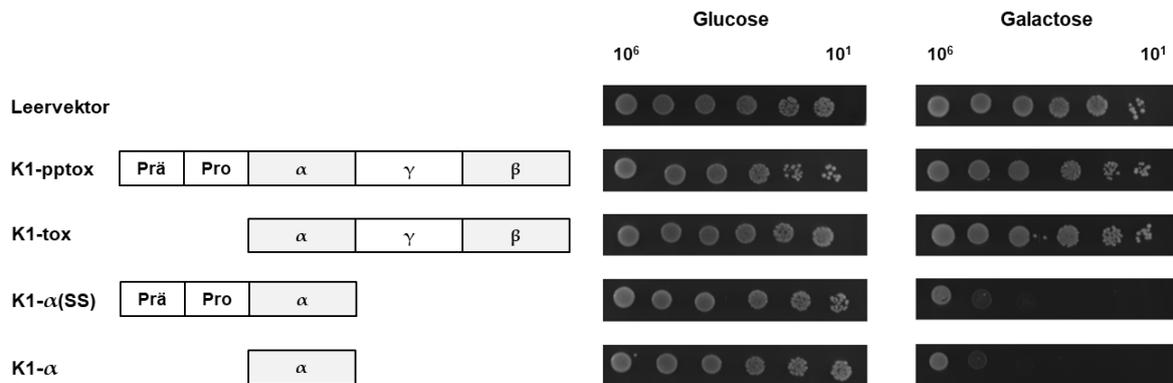


Abbildung 11: Induktion eines Selbstkillerphänotyps nach Expression von K1-Letalkonstrukten. Nach Transformation der dargestellten K1-Derivate bzw. des Leervektors (pYES2.1) in Zellen des sensitiven Hefestammes BY4742 wurde das Wachstum der Transformanten im seriellen Verdünnungstest analysiert. Hierzu wurden 10^6 - 10^1 Zellen auf Glucose-haltige (links, nicht-induzierte Bedingungen) bzw. Galactose-haltige Ura d/o Agarplatten (rechts, induzierte Bedingungen) aufgetropft. Das Wachstum der Zellen wurde nach Inkubation der Platten (3 d, 30 °C) dokumentiert, dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (n = 30), (verändert nach Gier *et al.*, 2017).

Die Expression des K1-Precursors (K1-pptox) sowie der um die Präpro-Region verkürzten Variante (K1-tox), die aufgrund des fehlenden ER-Imports im Cytosol verbleibt, induzierte bei keiner der betrachteten Verdünnungen eine Inhibierung des Zellwachstums. Die intrazelluläre Expression der α -Derivate führte hingegen zur Ausbildung eines Selbstkillerphänotyps, der durch deutliche Wachstumseinschränkungen unter induzierenden Bedingungen definiert ist. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen K1- α (SS) und K1- α , welchem die Präpro-Region fehlt, festgestellt werden (**Abb. 11**). Neben der Expression der K1-Derivate im pYES2.1-Vektor wurden die dargestellten Konstrukte zusätzlich über den *Low Copy*-Centromervektor pRS316 exprimiert, um potentielle Artefakte durch Überexpression des *Muli Copy*-Vektors ausschließen zu können. Allerdings wurden keine Unterschiede im Zellwachstum bzw. der Ausbildung des Selbstkillerphänotyps beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Neben Untersuchungen zum Wachstum der Transformanten wurde zudem über eine PI-Färbung analysiert, ob der beobachtete toxische Effekt der α -Derivate mit einer Bildung von Poren in der Plasmamembran korreliert werden kann. Hierzu wurde die Expression der K1-Konstrukte (pYES2.1) durch Inkubation der entsprechenden Transformanten über 16 h in

Galactose-haltigem Ura d/o-Medium induziert. Eine quantitative Bestimmung der PI-positiven Zellen erfolgte mittels FACS-Analyse, wobei Ethanol-behandelte Hefen sowie ungefärbte Hefen zur Einstellung des *Gates* verwendet wurden (**Abb. 12**).

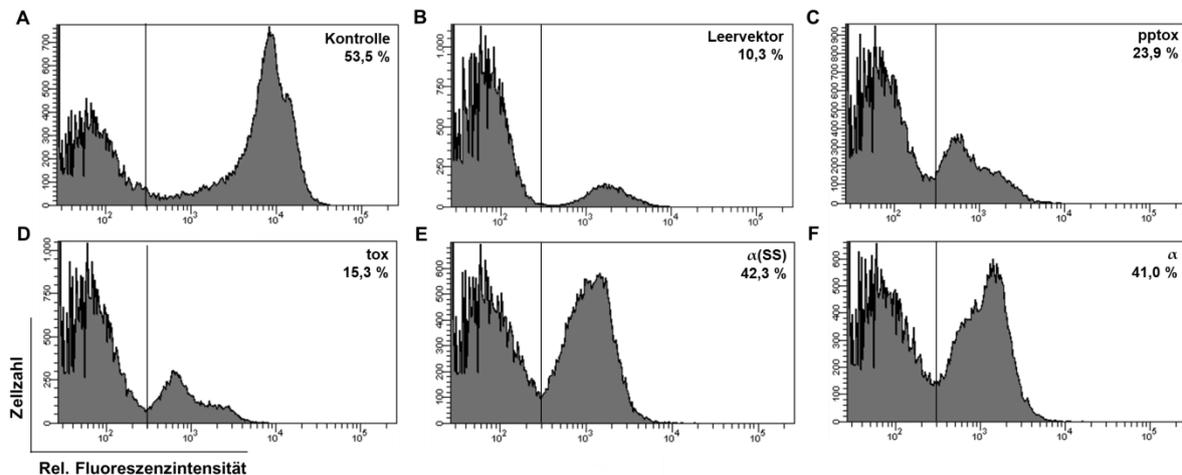


Abbildung 12: Porenbildung nach intrazellulärer Expression von K1-Derivaten. Nach Transformation von Zellen des Hefestammes BY4742 wurde die Expression der entsprechenden K1-Derivate (pYES2.1) durch Wachstum der Zellen in Galactose-haltigem Medium für 16 h bei 30 °C induziert. Die Zellen wurden mit 1 x PBS (pH 7,0) gewaschen, mit 1 µg/ml PI gefärbt und zur FACS-Analyse eingesetzt. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten untransformierte Hefezellen, welche mit 1.000 AU K1-Toxin über 1 h (20 °C) inkubiert wurden (**Kontrolle, A**) sowie Leervektor-transformierte Zellen (**Leervektor, B**). Dargestellt sind repräsentative Histogramme für Hefezellen, die mit dem K1-Volllängentoxin (**pptox, C**), einer um die Präpro-Region verkürzten K1-Variante (**tox, D**) bzw. der K1- α -Untereinheit mit (**α (SS), E**) sowie ohne Präpro-Region (**α , F**) transformiert wurden. Der entsprechende Prozentsatz an PI-positiven Zellen ist in der entsprechenden oberen rechten Ecke angegeben. Ethanol-behandelte sowie ungefärbte Zellen wurden zur Einstellung des *Gates* verwendet, es wurden jeweils 50.000 Events für jedes Konstrukt gemessen (n = 3), (verändert nach Gier *et al.*, 2017).

Wie bereits in den vorherigen Versuchen beobachtet, führte die Inkubation sensibler Zellen mit K1-Killertoxin zu einer positiven PI-Färbung (53,5 % PI-positive Zellen), was auf eine Disruption der Plasmamembran hindeutet, wohingegen für Leervektor-transformierte Zellen lediglich 10 % der Zellen als PI-positiv detektiert wurden (**Abb. 12A** und **B**). Für Transformanten, die K1-pptox bzw. K1-tox exprimierten, waren 23,9 % bzw. 15,3 % der Zellen eindeutig PI-positiv, obwohl für diese Transformanten kein signifikanter Wachstumsdefekt im seriellen Verdünnungstest unter induzierten Bedingungen festgestellt werden konnte (**Abb. 12C** und **D**). Weiterhin konnten die Ergebnisse der FACS-Analyse deutlich zeigen, dass Transformanten, welche die K1-Letalkonstrukte exprimieren, eine signifikant höhere Anzahl PI-positiver Zellen ausbilden. Eine intrazelluläre Expression der α -Derivate induzierte mit 42,3 % (α (SS), **E**) bzw. 41,0 % (α , **F**) PI-positiven Zellen eine

Ausbildung von Poren in der Plasmamembran, die offenbar nicht vom Import der toxischen Untereinheit in den sekretorischen Weg abhängig war.

Sensitive Hefezellen, die mit dem K1-Vorläufer transformiert wurden, verhalten sich immun gegen extern appliziertes K1. Mit Hilfe einer Co-Transformation der Letalkonstrukte und dem wildtypischen K1-pptox wurde im Folgenden analysiert, ob der Mechanismus der Immunität auch den toxischen Effekt der Letalkonstrukte inhibieren kann. Hierzu wurden der wildtypische Precursor K1-pptox sowie die verkürzte Form K1-tox in den Hefeexpressionsvektor pYX242 subkloniert, welcher unter der transkriptionellen Kontrolle eines konstitutiven *TPI*-Promoters steht. Das Wachstum der Transformanten wurde erneut mit Hilfe eines seriellen Verdünnungstest analysiert (**Abb. 13**).

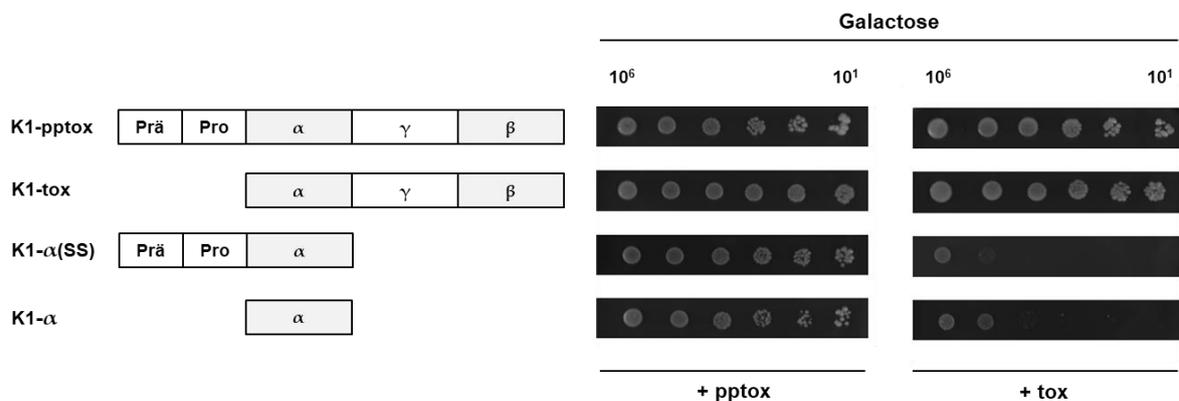


Abbildung 13: Co-Expression des wildtypischen K1-pptox verhindert die Ausbildung eines suizidalen Phänotyps. Zellen der Hefe *S. cerevisiae* BY4742 wurden entweder mit K1-pptox (links) oder K1-tox (rechts) und den angegebenen K1-Derivaten co-transformiert. 10^6 bis 10^1 Zellen der Transformanten wurden in logarithmischen Verdünnungen auf Galactose-haltige (induzierte Bedingungen) Ura/Leu d/o-Agarplatten aufgetropft. Die Auswertung des Wachstums erfolgte nach einer Inkubation für 3 d bei 30 °C. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (n = 30), (verändert nach Gier *et al.*, 2017).

Die Co-Expression der K1-Letalkonstrukte mit dem wildtypischen Precursormolekül (K1-pptox) führte zu einer vollständigen Inhibition des zuvor beobachteten Selbstkillerphänotyps (**Abb. 13**). Die Ausbildung dieser funktionalen Immunität konnte jedoch lediglich bei Co-Transformation mit dem K1-pptox beobachtet werden. Zellen, die mit K1-tox, einer verkürzten Form des Vorläufermoleküls ohne ER-Importsequenz, co-transformiert wurden, zeigten deutliche Wachstumsdefekte. Zudem konnte das K1-Vorläufermolekül sowohl die toxische Wirkung von α (SS), welches in den sekretorischen Weg importiert wird, als auch von α , welches cytosolisch vorliegt, inhibieren. Unter nicht-induzierenden Bedingungen konnte keine Einschränkung des Wachstums beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.2. Substitution der Cysteinreste des K1-Toxins

Trotz ihres unterschiedlichen toxischen Mechanismus können die Killertoxine K1 und K28 in die Gruppe der klassischen A/B-Toxine eingeordnet werden. Nach vollständiger Prozessierung im sekretorischen Weg der Wirtszelle bestehen die reifen Heterodimere aus einer toxischen α - und einer β -Untereinheit, welche wesentlich für die Bindung an die Zielzelle ist. Beide Toxinuntereinheiten sind über mindestens eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Neuere Untersuchungen der Cysteinreste des K28-Vorläuferproteins konnten nicht nur zeigen, dass eine zusätzliche intramolekulare Disulfidbrücke in β ausgebildet wird, sondern implizieren auch die essentielle Rolle des freien Thiolrests innerhalb des pH-abhängigen letalen Mechanismus des Toxins. Im Gegensatz zu K28, welches aufgrund seiner Aminosäuresequenz lediglich eine einzelne intermolekulare Disulfidbrücke ausbilden kann, besitzt K1 in jeder Haupttoxinuntereinheit jeweils drei Cysteinreste an den Positionen C92, C95, C107 in α und C239, C248, C312 in β . Das bestehende Modell der Heterodimer-Struktur sieht die Bildung von drei Disulfidbrücken mit den Paarungen C92-C248, C95-C312 und C107-C239 vor, wobei diese Hypothese allerdings lediglich auf berechneten Sequenzähnlichkeiten und nicht auf experimentellen Daten beruht. Mit Hilfe eines Hydropathie-Plots, der anhand der Aminosäureverteilung die Hydrophilie bzw. Hydrophobie unterschiedlicher Bereiche eines Proteins berechnet, kann gezeigt werden, dass alle Cysteinreste der α -Untereinheit innerhalb eines kleinen hydrophilen Bereich (AS 92-111) liegen (**Abb. 14**).

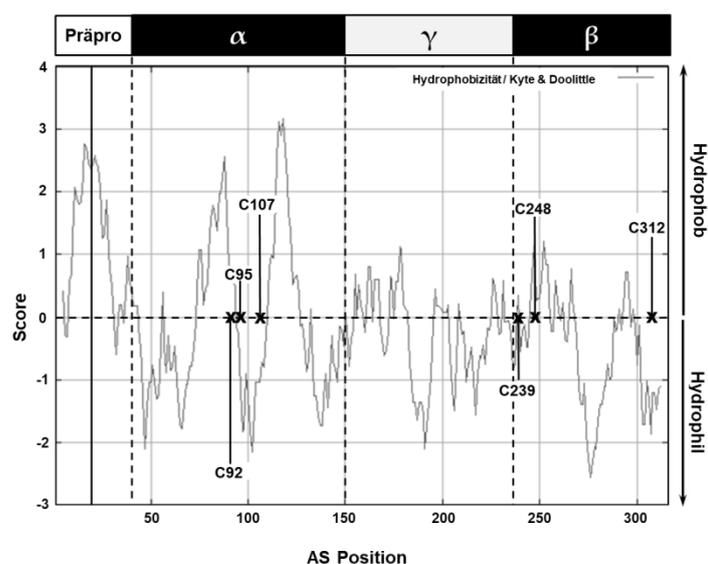


Abbildung 14: Position der Cysteinreste innerhalb des K1-Vorläuferproteins. Dargestellt ist ein Hydropathie-Plots nach Kyle & Doolittle (generiert mittels ExPASy). Die Cysteine C92, C95, C107 in α und C239, C248, C312 in β sind durch schwarze Kreuze markiert.

Der hydrophile Bereich befindet sich genau zwischen den stark hydrophoben Regionen der α -helikalen Strukturen (AS 72-91 und AS 112-117), welche für die Einlagerung der Untereinheit in zelluläre Membranstrukturen verantwortlich gemacht werden (Zhu & Bussey, 1991). Aus diesem Grund sollte durch Substitution der Cysteine mit der Aminosäure Serin nicht nur die Anzahl bzw. Paarung der ausgebildeten Disulfidbrücken, sondern auch der Einfluss der Cysteine auf Toxizität und Immunität untersucht werden. Aufgrund der Lage der Cysteinreste in α (**Abb. 14**) wurden zudem mutierte Letalkonstrukte konstruiert, um potentielle Effekte der Serin-Substitution auf den porenbildenden Effekt, d. h. die Insertion der α -Untereinheit in die Membran, zu analysieren.

In ersten Experimenten wurden im Rahmen der Masterarbeit von Matthias Lermen („Analyse der Ausbildung von Disulfidbrücken im viralen Killertoxin K1“) K1-Volllängenderivate mit Einzel-, Doppel- bzw. Tripelmutationen in beiden Toxinuntereinheiten in den sensitiven Hefestamm BY4742 transformiert. Zunächst wurde die potentielle Ausbildung eines Selbstkillerphänotyps mittels serieller Verdünnungstests untersucht. Hierbei konnte für keines der Konstrukte eine signifikante Veränderung der Wachstumsrate unter induzierten Bedingungen beobachtet werden, so dass eine Induktion des Selbstkillerphänotyps ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss wurde die Fähigkeit der Heterodimer-Sekretion der Transformanten mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen qualitativ überprüft. Hierzu wurden transformierte Hefen drei Tage in Galactose-haltigem Ura d/o-Medium kultiviert (30 °C) und die Proteine des Überstands der induzierten Kulturen wurden durch Zugabe von TCA präzipitiert; als Kontrolle dienten Leervektor-transformierte Zellen sowie Transformanten, die wildtypisches Toxin exprimierten (WT-pptox) und K1-Toxinkonzentrat (**Abb. 15**).

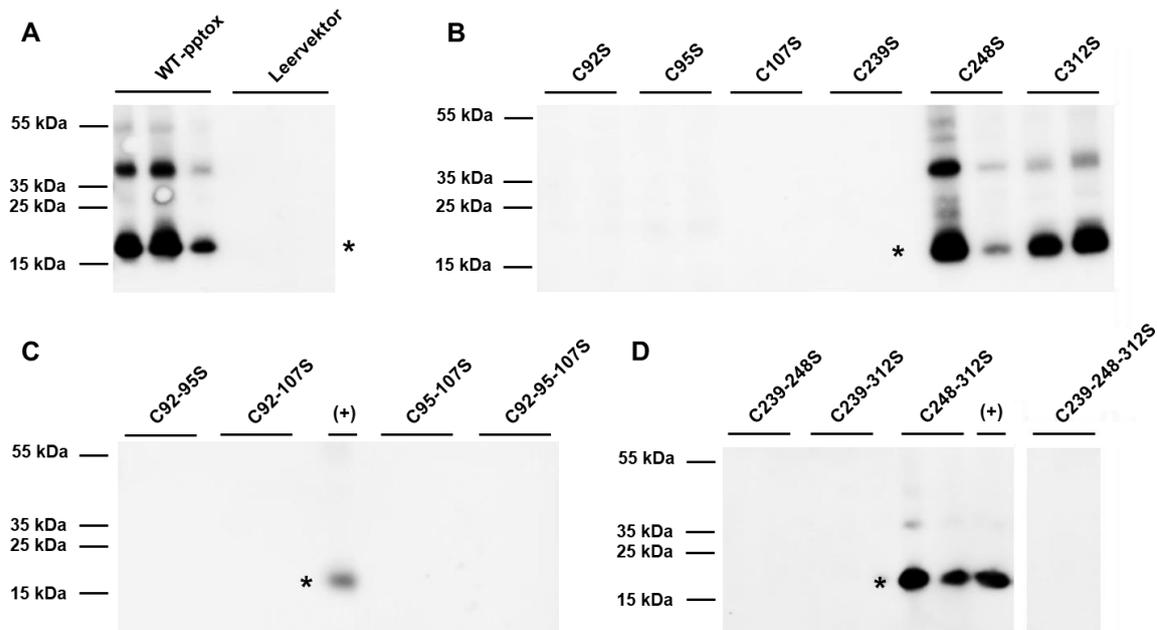


Abbildung 15: Inhibierung der Heterodimer-Sekretion durch Cystein-Substitution in K1- α -Untereinheit. Die Analyse der Toxinsekretion transformierter Zellen des Stammes BY4742 erfolgte mittels Western Analyse unter Verwendung eines K1-spezifischen polyklonalen Antikörpers (α -K1, 1:1.000); die Laufhöhe des K1-Dimers ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **A** K1-pptox (WT-pptox) und der Leervektor (pYES2.1) dienten als Kontrollen. **B** Cystein-Einzelmutanten in α und β . **C** Doppel- und Dreifachmutationen in α . **D** Doppel- und Dreifachmutationen in β . TCA-präzipitiertes K1-Konzentrat wurde als zusätzliche Kontrolle verwendet (+). Zur Visualisierung wurden repräsentative Bildausschnitte ausgewählt (n = 5), (verändert nach Gier *et al.*, 2019b).

Mit Hilfe der Western Analyse konnten toxinspezifische Signale bei einer Laufhöhe von ca. 18 kDa für die eingesetzten Positivkontrollen (WT-pptox und K1-Toxinkonzentrat) detektiert werden (**Abb. 15**). Vergleichbare Signale wurden lediglich in den Überständen der Einzelmutanten C248S, C312S sowie der Doppelmutante C248-312S beobachtet. Für Hefezellen, die K1-Derivate mit Mutationen der Cysteine in α exprimierten, konnte kein vergleichbares Signal detektiert werden. Ebenso konnte auch für die Einzelmutante C239S, die Doppelmutanten C239-248S und C239-312S sowie für die β -Tripelmutante kein Nachweis des K1-Heterodimers im Zellüberstand erbracht werden (**Abb. 15**). Um stammspezifische Unterschiede in der Sekretionseffizienz ausschließen zu können, wurden die Cysteinmutanten zudem in den *S. cerevisiae*-Stämmen BY4741 und SEY6210 exprimiert, allerdings konnte auch für diese Stämme keine Sekretion des K1-Heterodimers nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Da zur Herstellung des zur Verfügung stehenden Antikörpers Peptide zur Immunisierung verwendet wurden, deren Sequenzen u. a. auch die Cysteine der beiden Untereinheiten enthalten, so dass eine ausbleibende Detektion der mutierten K1-Heterodimere durch die

Zerstörung der Erkennungssequenz des Antikörpers nicht ausgeschlossen werden kann. Aus diesem Grund wurde im Anschluss die biologische Aktivität aller Cystein-mutierten K1-Derivate im MBA-Diffusionstest gegen den sensitiven Hefestamm BY4742 untersucht. Obwohl die Sekretion einiger β -Mutanten mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte, sezernierte keine der untersuchten Transformanten Toxin, welches einen toxischen Effekt gegen intakte sensitive Zellen ausüben konnte. Nach enzymatischem Abbau der Zellwand konnte allerdings für Transformanten, welche Toxin-Derivate mit der Einzelmutation C248S sowie die Doppelmutation C248-312S exprimierten, die Bildung eines Hemmhofs beobachtet werden. Neben BY4742 wurden auch die sensitiven Stämme BY4741, SEY6210 sowie der hypersensitive Stamm 192.2d in den MBA eingebettet, um mögliche Artefakte beispielsweise aufgrund einer sehr geringen Toxinsekretion auszuschließen; die zuvor erhaltenen Ergebnisse des Stammes BY4742 wurden allerdings bestätigt und keine Mutante mit Cystein-Substitution in der α -Untereinheit sezernierte nachweisbare Mengen an biologisch aktivem Toxin.

Neben der Toxizität der mutierten K1-Derivate wurde auch die Ausbildung einer funktionellen Immunität nach extrazellulärer Applikation von 1.000 AU eines K1-Toxinkonzentrats mittels MBA-Diffusionstest analysiert (**Abb. 16**).

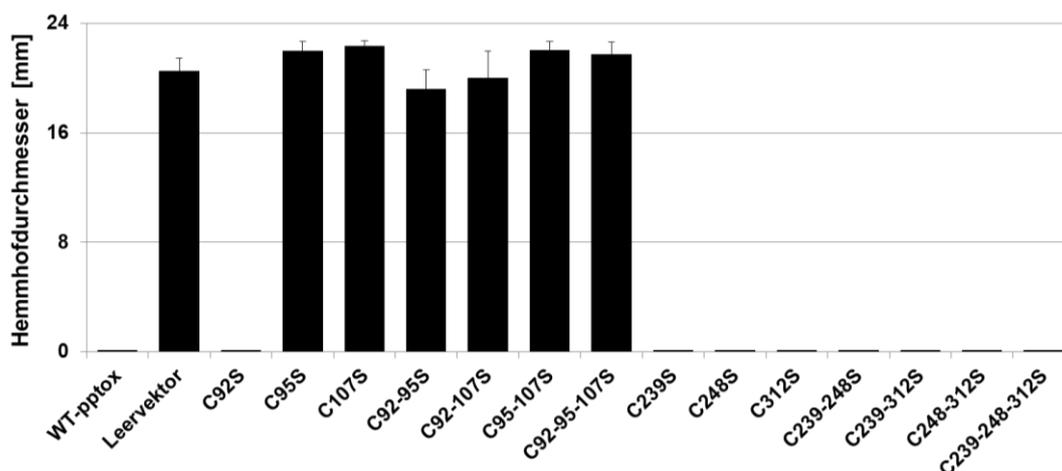


Abbildung 16: Verlust der funktionellen Immunität durch Mutation der Cysteine C95 und C107. Zellen der Hefe *S. cerevisiae* BY4742 wurden mit den Cystein-mutierten K1-Vollängenkonstrukten transformiert. 10^6 Zellen der Transformanten wurden in MBA (Ura d/o Galactose, pH 4,7) eingebettet und 1.000 AU K1-Konzentrat wurden appliziert. Die Ausbildung potentieller Hemmhöfe wurde nach einer Inkubation für 4 d bei 20 °C dokumentiert. Der wildtypische K1-Toxinvorläufer (WT-pptox) sowie der Leervektor pYES2.1 dienen als Kontrollen; dargestellt ist der Hemmhofdurchmesser [mm \pm Stabw] (n = 5), (verändert nach Gier *et al.*, 2019b).

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Immunität zeigten deutlich, dass eine Substitution der Cysteine C95 und C107 in der α -Untereinheit zu einem vollständigen Verlust der funktionellen Immunität führt (**Abb. 16**). Ebenso zeigten alle α -Doppelmutanten (C92-95S, C92-107S, C95-107S) sowie die Dreifachmutante (C92-95-107S) einen vergleichbaren Phänotyp. Lediglich Einzelmutanten, die eine Toxinvariante mit substituiertem Cystein an Position C92 exprimierten, bildeten einen funktionellen Immunitätsmechanismus aus, der dem wildtypischen Toxin entspricht. Im Fall der Cysteinmutationen der β -Untereinheit konnte für alle untersuchten Derivate die Ausbildung einer vollständigen intrinsischen Immunität gegen extrazellulär appliziertes K1-Toxin nachgewiesen werden (**Abb. 16**).

Weiterhin wurden mittels PCR Letalkonstrukte mit den verschiedenen Cysteinmutationen hergestellt und im sensitiven Hefestamm BY4742 exprimiert. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die Substitution der Cysteinreste generell einen Einfluss auf die toxische Wirkung der α -Untereinheit hat (**Abb. 17**).

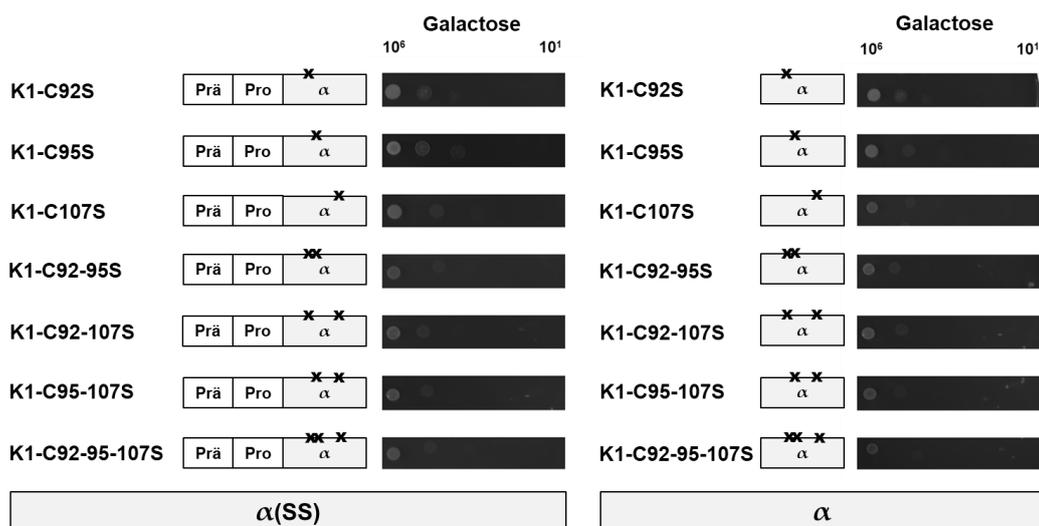


Abbildung 17: Mutationen der Cysteine in K1- α haben keinen Einfluss auf die Toxin-induzierte Porenbildung. Zellen des Hefestamms *S cerevisiae* BY4742 wurden mit den dargestellten Cystein-mutierte α -Derivaten mit (α (SS), links) bzw. ohne Präpro-Region (α , rechts) transformiert. Die Position der Punktmutationen ist mit einem schwarzen (x) gekennzeichnet. 10^6 bis 10^1 Zellen der Transformanten wurden in logarithmischen Verdünnungen auf Glucose-haltige (nicht-induzierte Bedingungen) und Galactose-haltige Agarplatten (induzierte Bedingungen) aufgetropft. Das Zellwachstum wurde nach 3 d Inkubation bei 30 °C dokumentiert. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments (n = 5), (verändert nach Gier *et al.*, 2019b).

Neben mutierten α (SS)-Konstrukten wurden ebenfalls Letalkonstrukte ohne Präpro-Region (K1- α) verwendet. Mit Hilfe des seriellen Verdünnungstest konnte die toxische Wirkung aller K1- α -Derivate unter induzierten Bedingungen nachgewiesen werden; unter nicht-induzierten Konditionen wurde keine Wachstumsinhibierung der Transformanten beobachtet (Daten nicht dargestellt). Ähnlich zu den wildtypischen Letalkonstrukten konnte auch für die Cystein-mutierten Derivate kein Unterschied zwischen α (SS) und α in der Ausprägung des Selbstkillerphänotyps beobachtet werden, so dass auch hier offenbar keine Abhängigkeit des toxischen Effekts der Konstrukte vom Import in das ER der Zelle vorliegt (**Abb. 17**). Da die untersuchten α -Derivate über einen *Multi Copy*-Vektor exprimiert wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Effekt auf dem alleinigen Überschuss an mutierten Letalkonstrukten beruhte. Aus diesem Grund wurden Co-Transformationsexperimente unter Verwendung von Cystein-mutierten Vollängentoxinen (pYX242) und wildtypischen α -Derivaten K1- α und K1- α (SS) im Vektor pRS316 bzw. pYES2.1 durchgeführt. Allerdings führte auch eine Veränderung des Verhältnisses von Letalkonstrukt zu Precursor zu keiner Veränderung des beobachteten Verlusts der Immunität (Daten nicht gezeigt).

Analog zu den wildtypischen Letalkonstrukten wurde zudem untersucht, ob eine Co-Transformation der mutierten α -Derivate mit dem wildtypischen K1-pptox eine Ausbildung der Immunität ermöglicht (**Abb. 18**).

					TOXIZITÄT		IMMUNITÄT		
		Prä	Pro		Intakte Zellen	Sphäroplasten			
α-UNTEREINHEIT	K1-C92S			^x α	γ	β	-	-	+
	K1-C95S			^x α	γ	β	-	-	-
	K1-C107S			^x α	γ	β	-	-	-
	K1-C92-95S			xx α	γ	β	-	-	-
	K1-C92-107S			^x α ^x	γ	β	-	-	-
	K1-C95-107S			^x α ^x	γ	β	-	-	-
	K1-C92-95-107S			xx α ^x	γ	β	-	-	-
β-UNTEREINHEIT	K1-C239S			α	γ	^x β	-	-	+
	K1-C248S			α	γ	^x β	-	+	+
	K1-C312S			α	γ	β ^x	-	-	+
	K1-C239-248S			α	γ	xx β	-	-	+
	K1-C239-312S			α	γ	^x β ^x	-	-	+
	K1-C248-312S			α	γ	^x β ^x	-	+	+
	K1-C239-248-312S			α	γ	xx β ^x	-	-	+

Abbildung 19: Zusammenfassung der beobachteten Phänotypen der K1-Derivate nach Substitution der Cysteine mit Serin. Dargestellt sind die Auswirkungen der jeweiligen Cystein-Serin-Substitution auf die Toxizität der jeweiligen K1-Derivate auf intakte Zellen und Sphäroplasten des sensitiven Stammes BY4742 sowie auf die Vermittlung der funktionellen Immunität gegen extern appliziertes wildtypisches K1-Toxin. Die Position der substituierten Cysteine ist durch schwarze Kreuze (x) markiert. Wildtypische Phänotypen der mutierten K1-pptox-Varianten sind durch (+) gekennzeichnet, während der Verlust von Toxizität sowie Immunität durch (-) dargestellt ist (verändert nach Gier *et al.*, 2019b).

Weiterhin zeigten die Ergebnisse der Mutationen der Cysteine in der β-Untereinheit, dass die Ausbildung der intrinsischen Immunität einer K1-produzierenden Zelle nicht mit der Sekretion bzw. der Bildung eines Toxin-Heterodimers zusammenhängt. So kann im Fall der Mutante C239-248-312S in keinem Fall eine Disulfidbrücke ausgebildet werden, allerdings waren Zellen, die dieses K1-Derivat exprimierten, vollständig immun gegen extrazellulär appliziertes Toxin.

3.2.3. Substitution und Mutation der Präpro-Region

Im Unterschied zu K28 wird bei K1 aufgrund der starken Hydrophobizität der ER-Importsequenz von einem co-translationalen Transport ausgegangen, was direkte mechanistische Implikationen für die Vermittlung der Immunität haben könnte. Zur weiteren Untersuchung des ER-Imports von K1 wurde eine Substitution der Prä- und Pro-Region des Toxins bzw. beider Regionen mit den entsprechenden Sequenzen des Killertoxin K28 durchgeführt, welches post-translational importiert wird. Zusätzlich wurde die Prä-Region durch die ER-Importsequenz des Hefe *Mating Factors a* (MFA) ausgetauscht, dessen post-translationaler Import ebenfalls experimentell bestätigt ist (Hansen *et al.*, 1986). Nach proteolytischer Abspaltung der Prä-Region an der AS-Position VA₂₆-L₂₇N durch den Signalpeptidase-Komplex erfolgt im weiteren Reifungsprozess eine Kex2p-abhängige Prozessierung an der Position PR₄₄-E₄₅A, welche die Pro-Region entfernt und den N-Terminus der reifen α -Untereinheit generiert. Die Aminosäureabfolge Pro-Arg stellt hierbei keine ideale Schnittstelle für die Endopeptidase Kex2p dar, so dass mit Hilfe von Punktmutationen im Folgenden untersucht wurde, inwiefern eine Veränderung der Schnittstelle die Toxizität bzw. die Vermittlung der Immunität beeinflusst. Hierbei wurde die Kex2p-Erkennungssequenz entweder durch eine Substitution des Prolinrests mit der basischen AS Lysin (P₄₃K) deutlich verbessert oder durch die Mutation des Argininrests zu einem Alanin (R₄₄A) vollständig zerstört. Sämtliche Derivate wurden in den *Multi Copy*-Vektor pYES2.1 kloniert und in Hefen des K1-sensitiven Wildtyps BY4742 transformiert. Die letale Wirkung von sezerniertem Toxin auf intakte sowie sphäroplastierte sensitive Hefen wurde ebenso wie die Vermittlung der funktionellen Immunität gegen extern appliziertes Toxin mit Hilfe von MBA-Diffusionstests untersucht (**Abb. 20**).

							TOXIZITÄT		IMMUNITÄT
							Intakte Zellen	Sphäroplasten	
SUBSTITUTION DER PRÄPRO-REGION	K1-MFA-Prä	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	~
	K1-K28-Prä	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	~
	K1-K28-Pro	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-K28(SS)	Prä	Pro	α	γ	β	-	~	~
MUTATION DER KEX2P-SCHNITTSTELLE	K1-P43K	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-R44A	Prä	Pro	α	γ	β	-	-	+

Abbildung 20: Charakterisierung der Phänotypen nach Mutation der K1-Präpro-Region. K28-spezifische Untereinheiten sind in Schwarz, die Prä-Region von MFA ist in Grau illustriert. Die Position der jeweiligen Punktmutation ist durch ein schwarzes Kreuz (x) angezeigt. Dargestellt sind die Auswirkungen der Mutationen auf die Toxizität der K1-Derivate gegen den sensitiven Stamm BY4742 (intakte bzw. sphäroplastierte Zellen). Zudem wurde die Ausbildung einer funktionellen Immunität nach Expression der mutierten K1-Precursormoleküle gegen extrazellulär appliziertes K1-Toxin untersucht. Ein wildtypischer Phänotyp ist durch (+) gekennzeichnet, der Verlust von Toxizität oder Immunität ist durch (-) dargestellt. Eine unvollständige Immunität (definiert durch die Bildung einer Zone eingeschränkten Wachstums) bzw. eine deutlich reduzierte Toxizität ist mit (~) verdeutlicht (verändert nach Gier *et al.*, 2019d).

Obwohl der Austausch der K1-Prä-Region mit den entsprechenden Regionen des K28-Killertoxins bzw. des MFA eine Verminderung der Immunität gegen extern appliziertes K1-Toxin zur Folge hatte, blieb der letale Effekt der sezernierten Toxin-Derivate sowohl gegen intakte sensitive Zellen, d. h. Hefen mit Zellwand, als auch gegen sphäroplastierte Zellen bestehen (**Abb. 20**). Im Fall einer Substitution der K1-Pro-Region mit der korrespondierenden Sequenz des K28-Toxins wurde ein vollständig wildtypischer Phänotyp beobachtet, welcher sich in einer Sekretion von biologisch aktivem Toxin sowie vollständiger Immunität äußerte. Wurde allerdings die komplette Präpro-Region gegen die analogen Sequenzen des K28-Killertoxins ausgetauscht, wurde neben einem Verlust bzw. einer deutlichen Verminderung der Immunität zudem auch ein Verlust der Toxizität verzeichnet; lediglich gegen sphäroplastierte sensitive Zellen konnte die Ausbildung einer minimalen Hemmzone beobachtet werden. Neben der Substitution ganzer Sequenzabschnitte wurde auch der Effekt einzelner Punktmutationen der Kex2p-Erkennungssequenz am C-Terminus der Pro-Region untersucht. Hierbei zeigten Hefezellen, die ein Volllängentoxin mit einer „optimierten“ Kex2p-Erkennungssequenz (P₄₃K) exprimierten, einen wildtypischen Phänotyp. Im Unterschied dazu führte die Zerstörung der Erkennungssequenz durch Substitution von Arg₄₄ mit der unpolaren Aminosäure Alanin (R₄₄A) zu einem vollständigen Verlust der Toxizität, wohingegen die Ausbildung der intrinsischen Immunität nicht beeinflusst wurde (**Abb. 20**).

Analog zu vorangegangenen Untersuchungen wurden Letalkonstrukte mit substituierter oder punktmutierter Präpro-Region mittels PCR konstruiert. Nach Transformation in den sensitiven Stamm BY4742 wurde das Zellwachstum mit Hilfe von seriellen Verdünnungstests analysiert (**Abb. 21**).

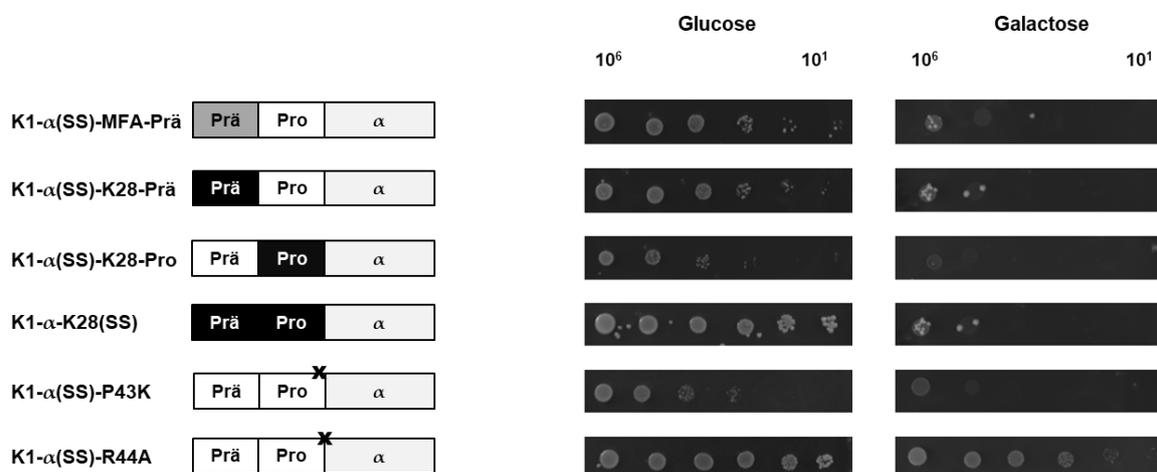


Abbildung 21: Substitution der K1-Präpro-Region hat keine Auswirkung auf den Selbstkillerphänotyp. Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes BY4742 wurden mit den dargestellten K1-α(SS)-Derivaten transformiert. Zur Durchführung des seriellen Verdünnungstests wurden 10⁶ bis 10¹ Zellen der Transformanten auf Glucose-haltige (nicht-induziert, links) und Galactose-haltige Agarplatten (induzierte Bedingungen, rechts) aufgetropft. Das Zellwachstum wurde nach 3 d (30 °C) dokumentiert; dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments (n = 15). K28-spezifische Untereinheiten sind schwarz dargestellt, die MFA-Prä-Region ist in grau illustriert; Punktmutationen sind durch ein schwarzes Kreuz (x) markiert; K28-spezifische Untereinheiten sind in schwarz, die Prä-Region von MFA ist grau illustriert (verändert nach Gier *et al.*, 2019d).

Die intrazelluläre Expression von wildtypischen K1-α-Derivaten induziert in sensitiven Stämmen eine signifikante Inhibierung des Wachstums unter induzierten Bedingungen, so dass diese Transformanten als Selbstkiller bezeichnet werden. Im Fall der Letalkonstrukte, deren N-terminale Präpro-Region partiell oder vollständig durch die entsprechenden Bereiche des K28-Toxins bzw. des MFA ausgetauscht wurde, konnten keine Abweichungen zu diesem Phänotyp dokumentiert werden (**Abb. 21**). Unter induzierenden Konditionen konnten weiterhin keine signifikanten Unterschiede innerhalb der mutierten Derivate detektiert werden. Allerdings wurden erste Wachstumsdefekte für α(SS)-MFA-Prä, α(SS)-K28-Prä und α(SS)-K28-Pro bereits auf Glucose-haltigen Agarplatten beobachtet. Neben dem vollständigen Austausch der Präpro-Region wurde zudem die Auswirkung einer veränderten Kex2p-Erkennungssequenz am C-Terminus der Pro-Region auf die letale Wirkung der α-Untereinheit untersucht. Wurde die Schnittstelle so mutiert, dass die Kex2p-Erkennungssequenz verstärkt wurde, konnte ein deutlicher suizidaler Phänotyp der Transformanten festgestellt werden, der ebenfalls bereits zu einer Retardierung des

Wachstums auf Glucose führte ($\alpha(\text{SS})\text{-P}_{43}\text{K}$). Der Aminosäureaustausch von Arginin zu Alanin hingegen, welcher die Schnittstelle zerstört ($\alpha(\text{SS})\text{-R}_{44}\text{A}$), führte zu einem Verlust des Selbstkillerphänomens in den entsprechenden Transformanten, so dass ein Zellwachstum auch bis zu einer hohen Verdünnung beobachtet werden konnte (**Abb. 21**).

Analog zu den wildtypischen Letalkonstrukten wurde im Folgenden die Vermittlung einer funktionellen Immunität durch das wildtypische K1-Volllängentoxin untersucht, wenn simultan eine Co-Expression mit den mutierten Letalkonstrukten durchgeführt wurde (**Abb. 22**).

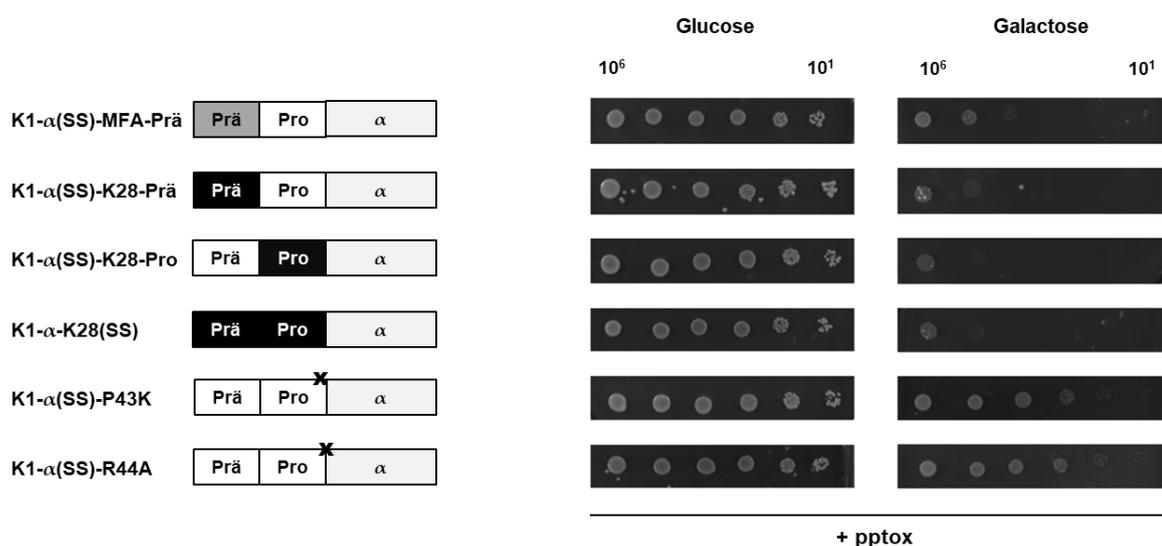


Abbildung 22: Substitution der K1-Präpro-Region verhindert die Ausbildung einer funktionellen Immunität. *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit den angegebenen mutierten $\alpha(\text{SS})$ -Derivaten im pYES2.1-Vektor und dem wildtypischen K1-pptox (pYX242) co-transformiert. Nach Selektion und Wachstum der Transformanten wurden 10^6 - 10^1 Zellen in logarithmischen Verdünnungsstufen auf Glucose- (nicht-induzierte Konditionen; links) und Galactose-haltige Ura/Leu d/o-Agarplatten (induzierte Kondition; rechts) aufgetropft. Das Hefewachstum wurde nach 3 d bei 30 °C dokumentiert. K28-spezifische Untereinheiten sind in schwarz, die Prä-Region von MFA ist grau illustriert; Punktmutationen sind durch ein schwarzes Kreuz (x) hervorgehoben. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 10), (verändert nach Gier *et al.*, 2019d).

Die Co-Transformation von $\alpha(\text{SS})$ -Derivaten mit vollständig oder teilweise substituierter Präpro-Region mit dem unmutiertem K1-Precursor-Molekül zeigte, im Gegensatz zu wildtypischen Letalkonstrukten, deutliche Wachstumsdefizite der Transformanten unter induzierten Bedingungen; hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Derivaten festgestellt werden. Im Fall einer Co-Expression des K1-pptox mit punktmutierten K1-Derivaten der Pro-Region, die in einer Veränderung der Kex2p-Erkennungssequenz resultieren, konnte der wildtypische Precursor die Ausbildung der intrinsischen Immunität gewährleisten, so dass keine Inhibierung des Wachstums beobachtet werden konnte (**Abb. 22**).

Zusammenfassend führte eine Substitution der Präpro-Region mit den analogen Untereinheiten des Killertoxins K28 bzw. des MFA zu keinen deutlichen Änderungen in der Toxinsekretion und der biologischen Aktivität, so lange lediglich eine der beiden Regionen betroffen war. Für die Ausbildung der Immunität wurden allerdings leichte Einschränkungen dokumentiert, die sich in einer Zone mit eingeschränktem Hefewachstum äußerte. Sobald beide Untereinheiten der Signalsequenz ausgetauscht wurden, konnte keine biologische Aktivität gegen intakte Zellen beobachtet werden und lediglich eine sehr stark eingeschränkte Toxizität gegen zellwandlose sensitive Hefen. Die Expression von Letalkonstrukten mit substituierter Präpro-Region induzierte einen deutlichen Selbstkillerphänotyp, der im Unterschied zu wildtypischen K1-Derivaten nicht durch die Co-Expression mit dem K1-Volllängentoxin inhibiert werden konnte. Eine Punktmutation, welche die Affinität der Kex2p-Erkennungssequenz N-terminal der Pro-Region negativ veränderte, führte zu einem vollständigen Verlust der Toxizität des Volllängentoxins sowie des entsprechenden Letalkonstrukts; die Ausbildung der intrinsischen Immunität blieb allerdings bestehen.

3.2.4. Substitution und Mutation der K1- γ -Untereinheit

Neben der Signalsequenz und den Haupttoxinuntereinheiten α und β besitzt das K1-Vorläufermolekül eine zusätzliche γ -Untereinheit, welche drei potentielle Glycosylierungsstellen an den Positionen N₁₈₁, N₂₀₃ und N₂₁₆ sowie eine intramolekulare Kex2p-Schnittstelle (KR₁₈₈) aufweist. Obwohl die genaue Funktion der γ -Untereinheit bisher nicht genau aufgeklärt werden konnte, übt sie wahrscheinlich eine Chaperon-ähnliche Rolle im Reifungsprozess des Toxins aus und ist zumindest partiell für die Vermittlung der Immunität notwendig (Zhu *et al.*, 1993). Im Folgenden wurden daher verschiedene Mutationen dieser Untereinheit durchgeführt, um ihre molekulare Funktion genauer zu analysieren; hierzu wurden die Glycosylierungsstellen durch eine Substitution des Asparagins mit der AS Glutamin zerstört. Zusätzlich wurden ein K1-Precursor mit punktmutierter intramolekularer Kex2p-Schnittstelle (K₁₈₇L) generiert sowie ein K1-Präprotoxin, dessen γ -Sequenz gegen die analoge γ -Region der K28-Toxins ausgetauscht wurde. Sämtliche Derivate wurden in den *Multi Copy*-Vektor pYES2.1 kloniert und in die sensitive Hefe BY4742 transformiert. Analog zu den vorherigen Untersuchungen wurde für diese Derivate ebenfalls die Toxizität des potentiell sezernierten Toxins sowie die Fähigkeit

des mutierten Precursors untersucht, Immunität gegen extern appliziertes K1-Toxin zu vermitteln (**Abb. 23**).

					TOXIZITÄT		IMMUNITÄT		
		Prä	Pro		Intakte Zellen	Sphäroplasten			
SUBSTITUTION MIT K28 γ -UNTEREINHEIT	K1-K28 γ	Prä	Pro	α	γ	β	-	-	+
	MUTATION DER KEX2P-SCHNITTSTELLE	K1-K187L	Prä	Pro	α	γ	β	+	+
GLYCOSYLIERUNGS-MUTANTEN	K1-N181Q	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-N203Q	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-N216Q	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-N181-203Q	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-N181-216Q	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-N203-216Q	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+
	K1-N181-203-216Q	Prä	Pro	α	γ	β	+	+	+

Abbildung 23: Charakterisierung der Phänotypen nach intrazellulärer Expression von K1-Präprotoxinen mit Substitution bzw. Mutation der K1- γ -Untereinheit. K28-spezifische Untereinheiten sind in Schwarz illustriert, die Position der Punktmutation ist durch ein schwarzes Kreuz (x) verdeutlicht. Dargestellt sind die Untersuchungen zur Toxizität der mutierten Vollängen-Derivate gegenüber intakten bzw. sphäroplastierte Zellen des sensitiven Stammes BY4742 sowie zur Ausbildung einer funktionellen Immunität gegen extrazellulär appliziertes K1-Toxin. Ein wildtypischer Phänotyp ist durch (+) gekennzeichnet, der Verlust von Toxizität oder Immunität ist durch (-) dargestellt. Die Ausbildung einer Zone mit eingeschränktem Zellwachstum (unvollständige Immunität) ist durch (~) verdeutlicht; UE: Untereinheit (verändert nach Gier *et al.*, 2019d).

Der Austausch der K1- γ -Untereinheit gegen die entsprechende Untereinheit des K28-Toxins bewirkte einen vollständigen Verlust der Toxizität sowohl gegen intakte als auch gegen sphäroplastierte Zellen des sensitiven Hefestammes BY4742; allerdings waren diese Transformanten nach wie vor immun gegen extern appliziertes wildtypisches K1-Toxin (**Abb. 23**). Für die Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten der Glycosylierungsstellen konnte hinsichtlich der Toxinsekretion überraschenderweise kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden. Sezerniertes Toxin war in der Lage sowohl Zellen mit intakter Zellwand als auch sphäroplastierte Zellen abzutöten, zudem verhielten sich alle Transformanten immun gegen extern appliziertes wildtypisches K1-Toxin. Wurde die zentral gelegene Kex2p-Schnittstelle innerhalb der γ -Untereinheit durch eine Punktmutation zerstört, wurde biologisch aktives K1-Toxin sezerniert, allerdings waren Hefen, die dieses Konstrukt exprimierten, nicht vollständig immun. Dieses K1-Derivat wurde zusätzlich in

den Expressionsvektor pYX242 subkloniert und mit wildtypischen Letalkonstrukten co-transformiert. Hierzu wurden neben den α -Derivaten K1- α und K1- α (SS) im Vektor pYES2.1 auch ein α (SS)-Derivat im *Low Copy*-Vektor pRS316 zur Co-Transformation verwendet; das Wachstum der transformierten Hefen wurde mittels seriellen Verdünnungstest analysiert (**Abb. 24**).

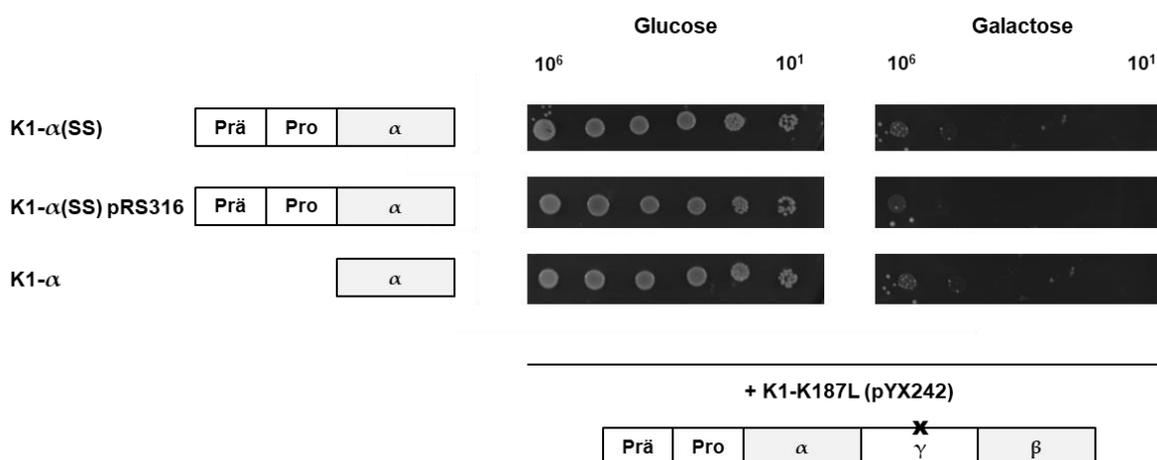


Abbildung 24: Inhibierung der funktionellen Immunität durch Punktmutation der intramolekularen Kex2p-Schnittstelle in K1- γ . Hefezellen des sensitiven Stammes BY4742 wurden mit dem punktmultierten K1-Vorläufer K1-K₁₈₇L (im Vektor pYX242) und den α -Derivaten (α (SS) und α im Vektor pYES2.1) bzw. α (SS) im *Low Copy*-Vektor pRS316 co-transformiert. 10^6 bis 10^1 Zellen der entsprechenden Transformanten wurden auf Glucose-haltige (nicht-induziert, links) bzw. Galactose-haltige Ura/Leu d/o Agarplatten (induziert, rechts) aufgetropft. Nach einer Inkubation für 3 d bei 30 °C wurde das Wachstum der Kolonien dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 5), (verändert nach Gier *et al.*, 2019d).

Die Co-Transformation zeigte, dass die Punktmutation die Ausbildung der intrinsischen Immunität gegen wildtypische Letalkonstrukte vollständig inhibiert (**Abb. 24**). Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den α -Derivaten mit (α (SS)) bzw. ohne Präpro-Region (α) festgestellt werden. Zusätzlich konnte der mutierte K1-Precursor auch bei Verwendung eines Letalkonstrukts, welches über einen *Low Copy*-Vektor codiert wurde, keine Immunität vermitteln. Dies lässt darauf schließen, dass eine intramolekulare Kex2p-abhängige Prozessierung der γ -Untereinheit essentiell zur Vermittlung der Immunität beiträgt.

Frühere Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass eine Expression eines K1- α -Derivats, das C-terminal um die ersten 31 AS der γ -Sequenz ergänzt wurde, ausreicht um Immunität gegen appliziertes K1-Toxin zu gewährleisten (Zhu *et al.*, 1993). Basierend auf der intramolekularen Kex2p-Schnittstelle in der γ -Untereinheit wurden Letalkonstrukte hergestellt, die C-terminal entweder um die komplette γ -Sequenz oder die ersten 39 AS

dieser Untereinheit erweitert wurden. Die Konstrukte wurden im seriellen Verdünnungstest auf ihre Toxizität untersucht (**Abb. 25**).

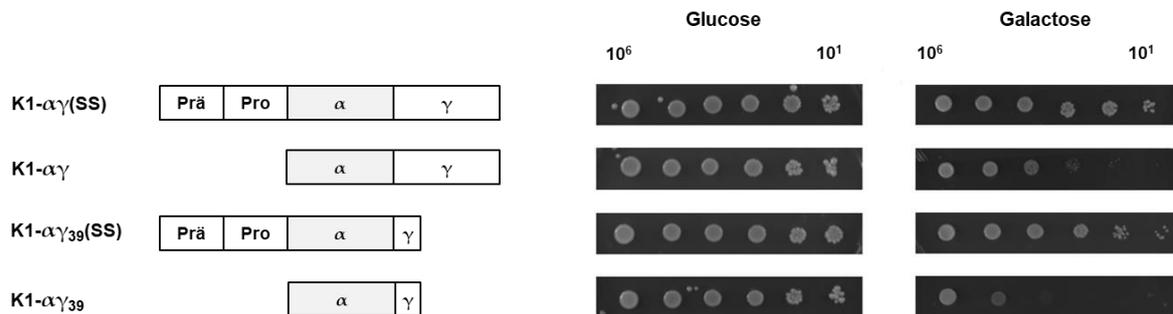


Abbildung 25: K1- γ -Untereinheit ist essentiell zur Ausbildung einer funktionellen Immunität. Nach Transformation von Zellen des sensitiven Hefestammes BY4742 mit den dargestellten K1- $\alpha\gamma$ -Derivaten (mit bzw. ohne N-terminaler Präpro-Region (SS) wurden serielle Verdünnungstests durchgeführt. Hierzu wurden die Transformanten in logarithmischen Verdünnungen von 10^6 bis 10^1 Zellen auf Glucose-haltige (nicht-induziert, links) bzw. Galactose-haltige Ura d/o Agarplatten (induziert, rechts) aufgetropft; das Wachstum wurde nach 3 d bei 30 °C dokumentiert; dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 30), (verändert nach Gier *et al.*, 2019d).

Die Ergebnisse der seriellen Verdünnungstests unter Verwendung von K1- $\alpha\gamma$ -Konstrukten zeigten eine deutliche Verminderung des Selbstkillerphänotyps durch die C-terminale Addition der γ -Sequenz (**Abb. 25**). Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied im Wachstum der Transformanten beobachtet, die $\alpha\gamma$ -Derivate mit der kompletten γ -Untereinheit oder einer verkürzten γ -Sequenz (39 AS) exprimierten, wodurch bestehende Literaturdaten bestätigt werden konnten (Zhu *et al.*, 1993). Deutliche Unterschiede zeigten sich allerdings im Vergleich der Konstrukte mit und ohne Präpro-Region. Während die Derivate $\alpha\gamma$ (SS) bzw. $\alpha\gamma_{39}$ (SS) unter induzierten Bedingungen kein Wachstumsdefizit aufwiesen, wurde das Wachstum der Hefen, welche analoge Konstrukte ohne Präpro-Region exprimieren, deutlich reduziert (**Abb. 25**).

Analog zu vorherigen Experimenten wurde eine Co-Transformation dieser Konstrukte mit dem wildtypischen K1-Volllängentoxin bzw. einer um die Präpro-Region verkürzten Version des Precursors (K1-tox) durchgeführt (**Abb. 26**).

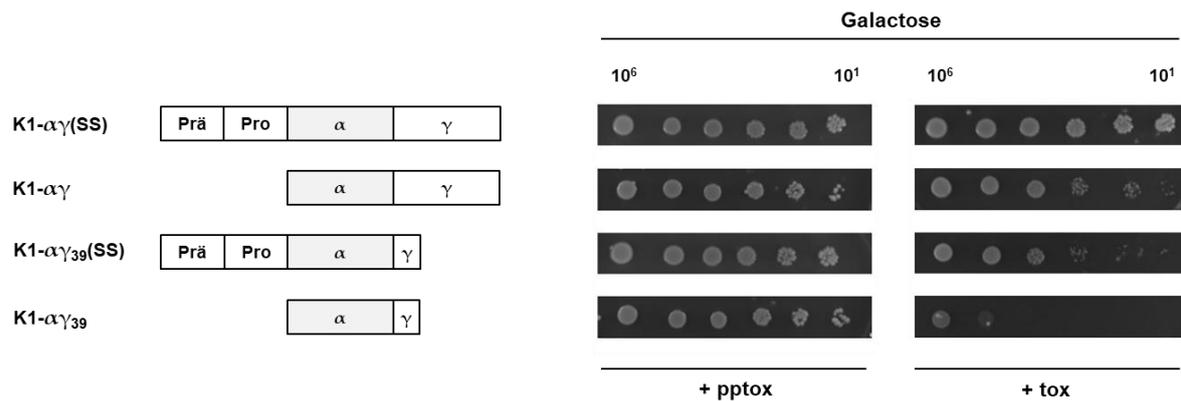


Abbildung 26: Co-Transformation mit K1- $\alpha\gamma$ -Derivaten führt zur Ausbildung vollständiger Immunität. *S. cerevisiae* BY4742 wurde mit den dargestellten $\alpha\gamma$ -Derivaten und dem K1-Precursor (K1-pptox, links) bzw. der verkürzten Version ohne Präpro-Region (K1-tox, rechts) co-transformiert. 10⁶ bis 10¹ Zellen der entsprechenden Transformanten wurden auf Glucose-haltige (nicht-induzierte Kondition; nicht dargestellt) und Galactose-haltige Ura/Leu d/o-Agarplatten (induzierte Kondition) aufgetropft. Nach einer Inkubation für 3 d bei 30 °C wurde das Wachstum der Kolonien dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 15), (verändert nach Gier *et al.*, 2019d).

Die Ergebnisse der Co-Transformation verdeutlichen, dass ein Anfügen der γ -Untereinheit, unabhängig von der Anzahl der Aminosäuren, die Vermittlung der Immunität durch den Precursor nicht einschränkt. Bei Co-Expression mit dem verkürzten K1-Precursor (K1-tox) wurde lediglich für die Derivate K1- $\alpha\gamma_{39}$ eine deutliche bzw. für K1- $\alpha\gamma_{39}$ (SS) eine leichte Wachstumsinhibierung der Transformanten dokumentiert (**Abb. 26**); diese Ergebnisse korrelieren hierbei mit den Beobachtungen der Einzeltransformationen.

Zusammenfassend konnte hiermit gezeigt werden, dass eine Punktmutation innerhalb der Glycosylierungsstellen von K1- γ einen vollständig wildtypischen Phänotyp hervorruft, während eine Substitution der kompletten γ -Sequenz zu einem Verlust der Toxizität bei gleichzeitig bestehender Immunität gegen extrazellulär appliziertes K1-Toxin führt. Wurde die intramolekulare Kex2p-Schnittstelle durch eine Punktmutation zerstört, konnte zwar die Sekretion von biologisch aktivem Toxin verzeichnet werden, allerdings waren die entsprechenden Transformanten nicht vollständig immun gegen extrazellulär appliziertes, wildtypisches K1-Toxin. Wesentlich deutlicher wurde der Verlust der Immunität, sobald das mutierte Volllängentoxin mit dem wildtypischen Letalkonstrukt co-exprimiert wurde; hierbei war der Phänotyp unabhängig vom gewählten Vektorsystem (pYES2.1 bzw. pRS316) und dem Vorhandensein der Präpro-Region.

Mit Hilfe der generierten $\alpha\gamma$ -Konstrukte konnten die Ergebnisse von Zhu *et al.*, (1993), die eine C-terminale Erweiterung der α -Untereinheit um 31 Aminosäuren der γ -Sequenz durchführten, bestätigt werden. Hierbei führte eine Verlängerung der angefügten γ -

Untereinheit um weitere acht Aminosäuren zu keinem zusätzlichen Effekt, so dass weiterhin eine Inhibierung des durch α -induzierten Selbstkillerphänotyps beobachtet werden konnte. Allerdings zeigten K1-Derivate, die aufgrund der Präpro-Region in das ER importiert werden, eine signifikant stärkere Ausbildung der Immunität.

3.2.5. Expression von Letalkonstrukten mit C-terminalen Argininresten

Im Verlauf der Reifung des K1-Precursors im sekretorischen Weg der Zellen werden die C- bzw. N-Termini der Toxinuntereinheiten α und β durch die proteolytische Aktivität der Endopeptidase Kex2p generiert. Hierbei werden die γ -Untereinheit sowie die Pro-Region entfernt, gleichzeitig verbleiben am C-Terminus der α -Untereinheit zwei Argininreste, die in darauffolgenden Prozessierungsschritten durch die Carboxypeptidase Kex1p abgespalten werden (Cooper & Bussey, 1989). Im Unterschied zu K28, für dessen Toxizität die Aktivität von Kex1p essentiell ist, konnte die physiologische Relevanz dieses Prozessierungsschrittes für K1 noch nicht gezeigt werden. Mittels PCR wurden Letalkonstrukte, denen C-terminal ein bzw. zwei Argininreste angefügt wurden, hergestellt, in den Vektor pYES2.1 kloniert und in der sensitiven Hefe BY4742 exprimiert. Auswirkungen der basischen Reste auf die toxische Wirkung der α -Untereinheit wurden mit Hilfe eines seriellen Verdünnungstests untersucht (**Abb. 27**).

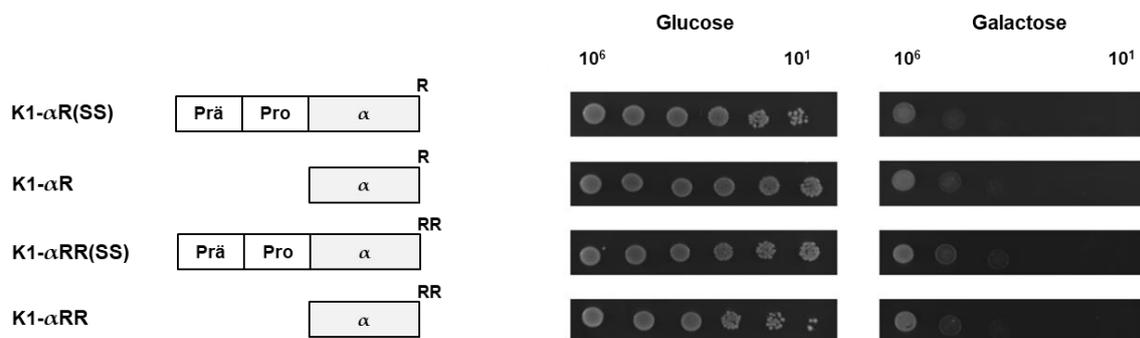


Abbildung 27: C-terminale Argininreste zeigen keinen Einfluss auf die Porenbildung der α -Untereinheit. Hefezellen des Stammes *S. cerevisiae* BY4742 wurden mit den dargestellten Letalkonstrukten transformiert und in logarithmischen Verdünnungsstufen von 10^6 - 10^1 Zellen auf Glucose- (nicht induzierte Bedingungen; links) bzw. Galactose-haltige Ura d/o-Agarplatten (induzierte Bedingungen; rechts) aufgetropft. Das Wachstum der Transformanten wurde nach einer Inkubation für 3 d bei 30 °C dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 30).

Die seriellen Verdünnungstests zeigten, dass die Addition von Argininresten am C-Terminus keine Auswirkung auf die toxische Wirkung der α -Untereinheit hat und damit auch die vermeintliche Einlagerung der hydrophoben Sequenzabschnitte in die Membran

nicht prinzipiell behindert wird. Hierbei konnte kein Unterschied zwischen der Addition eines bzw. zweier Argininreste festgestellt werden (**Abb. 27**).

Im Folgenden wurde mittels Co-Transformationsexperimenten analysiert, ob die C-terminale Addition der basischen Reste einen Einfluss auf die Vermittlung der intrinsischen Immunität hat (**Abb. 28**).

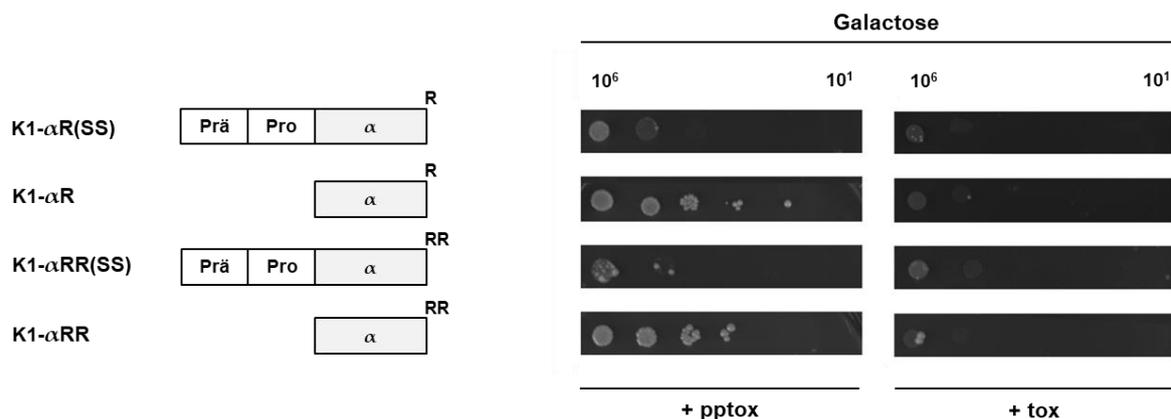


Abbildung 28: Inhibierung des Immunitätsmechanismus durch di-basische Reste am C-Terminus der α -Untereinheit. Die Co-Transformation wurde unter Verwendung des wildtypischen K1-pptox (links) bzw. der verkürzten Version ohne Präpro-Region (rechts) und den angegebenen α -Derivaten in der sensitiven Hefe BY4742 durchgeführt. Transformanten wurden in logarithmischen Verdünnungsstufen (10^6 - 10^1 Zellen) auf und Galactose-haltige Ura/Leu d/o-Agarplatten (induziert) aufgetropft. Das Wachstum der Kolonien wurde nach Inkubation (3 d, 30 °C) dokumentiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 15).

Wie anhand der Ergebnisse der Co-Transformationen deutlich wird, führte die C-terminale Addition der Argininreste an die α -Untereinheit zu einem nahezu vollständigen Verlust der Immunität bei Co-Expression mit dem K1-Volllängentoxin. Hierbei war die Ausprägung der Wachstumsinhibition unabhängig von der Anzahl der addierten Arginine, allerdings zeigten α -Derivate mit Präpro-Region einen wesentlich stärker ausgeprägten Selbstkillerphänotyp. Hefezellen, die zur Kontrolle mit der verkürzten K1-Precursorvariante co-transformiert wurden, zeigten wie erwartet kein Wachstum unter induzierten Bedingungen (**Abb. 28**). Die entsprechend durchgeführten Kontrollen unter nicht-induzierten Bedingungen (Glucose) zeigten keine Einschränkung des Hefewachstums auf (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt konnte kein Einfluss der C-terminalen Addition von einem bzw. zwei Argininresten auf die Ausbildung des Selbstkillerphänotyps beobachtet werden. Wurde allerdings eine Co-Transformation mit dem wildtypischen K1-pptox durchgeführt, so zeigten sich signifikante Einschränkungen in der Vermittlung der Immunität. Hierbei wurde

die deutlichste Reduktion des Zellwachstums beobachtet, sobald Letalkonstrukte mit Präpro-Region und den C-terminalen Argininresten co-exprimiert wurden, was auf eine Interferenz der basischen Reste mit dem Precursor im ER hindeutet und die biologische Bedeutung der Kex1p-Prozessierung der α -Untereinheit verdeutlicht.

3.2.6. C-terminales Tagging der K1-Toxinuntereinheiten

Ein immunologischer Nachweis von Proteinen ermöglicht eine Vielzahl von unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten. Die Produktion spezifischer Antikörper gegen das Killertoxin K1 ist hierbei vor allem durch die eingeschränkte Auswahl von Erkennungssequenzen mit ausreichender Immunogenität erschwert. Sämtliche zuvor durchgeführten Antikörper-basierten Nachweise des K1-Heterodimers wurden in dieser Arbeit durch Verwendung eines polyklonalen Antikörpers durchgeführt, der von Prof. Michael Thumm (Institut für Zellbiochemie, Universitätsmedizin *Göttingen*) zur Verfügung gestellt wurde. Zur Immunisierungsreaktion wurde hierbei eine Mischung von insgesamt drei Peptiden beider Haupttoxinuntereinheiten eingesetzt. Mit diesem Antikörper wurde zwar ein Nachweis des K1-Heterodimers im Zellüberstand ermöglicht, allerdings war aufgrund starker Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen ein intrazellulärer Nachweis des K1-Toxins nicht erfolgreich. Zusätzlich wurde die Durchführbarkeit bestimmter Versuchsansätze deutlich eingeschränkt, da eine spezifische Erkennung der einzelnen Untereinheiten des Killertoxins nicht möglich war.

Eine weitere Möglichkeit, die Toxinuntereinheiten einzeln nachzuweisen, stellt das Anfügen von kleinen Peptid-Tags dar, welche diverse molekularbiologische Anwendungen ermöglichen bzw. erleichtern könnten. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob das Einbringen solcher Tags in den K1-Precursors mit der Sekretion von biologisch aktivem Toxin bzw. der der Vermittlung der Immunität interferiert. Hierzu wurden K1-Derivate hergestellt, deren jeweilige C-Termini entweder um einen V5-Tag (α -Untereinheit) bzw. einen Flag-Tag (β -Untereinheit) erweitert wurden. Zudem wurden Letalkonstrukte konstruiert, die den Einfluss des V5-Tags auf die α -induzierte Porenbildung beleuchten sollten (**Abb. 29**).

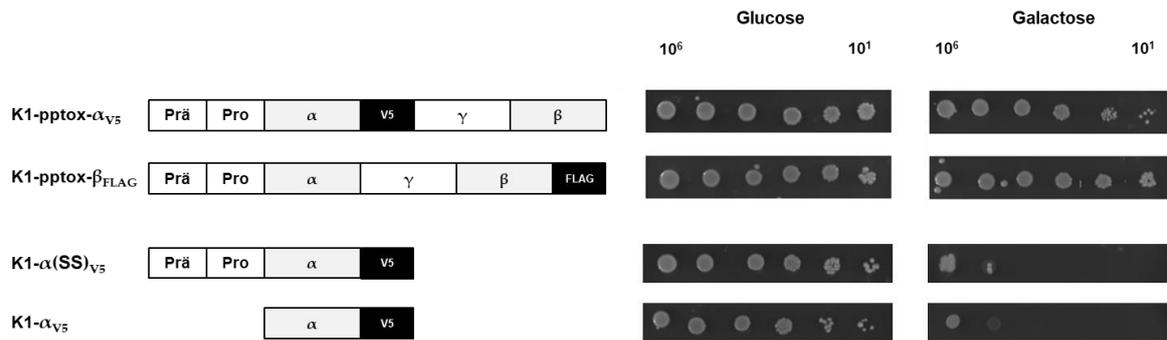


Abbildung 29: Die Addition des V5-Tags interferiert nicht mit der toxischen Wirkung von K1- α . Hefen des Stammes *S. cerevisiae* wurden mit den dargestellten K1-Derivaten transformiert, die angefügten Tags (V5 bzw. Flag) sind schwarz illustriert. Die Transformanten wurden in logarithmischen Verdünnungen von 10^6 bis 10^1 Zellen auf Glucose- (nicht-induzierte Kondition; links) bzw. Galactose-haltige Ura d/o-Agarplatten (induzierte Kondition; rechts) aufgetropft. Das Hefewachstum wurde nach 3 d Inkubation bei 30 °C dokumentiert; dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (n = 15).

Serielle Verdünnungstests zeigten, dass die Expression der getaggteten Precursormoleküle unter induzierten Bedingungen kein Wachstumsdefizit, d. h. keinen Selbstkillerphänotyp, hervorriefen (**Abb. 29**). Die Expression von V5-getaggteten α -Derivaten führte hingegen zu deutlichen Wachstumsdefiziten der Transformanten, die sich nicht von den wildtypischen ungetaggteten α -Letalkonstrukten unterschieden; ebenso spielte die Präpro-Region keine Rolle in der Induktion des beobachteten Selbstkillerphänotyps. Potentielle Einflüsse des C-terminalen V5-Tags auf die Interaktion mit dem K1-Volllängentoxin zur Vermittlung der intrinsischen Immunität wurden mit Hilfe von Co-Transformationsexperimenten untersucht (**Abb. 30**).

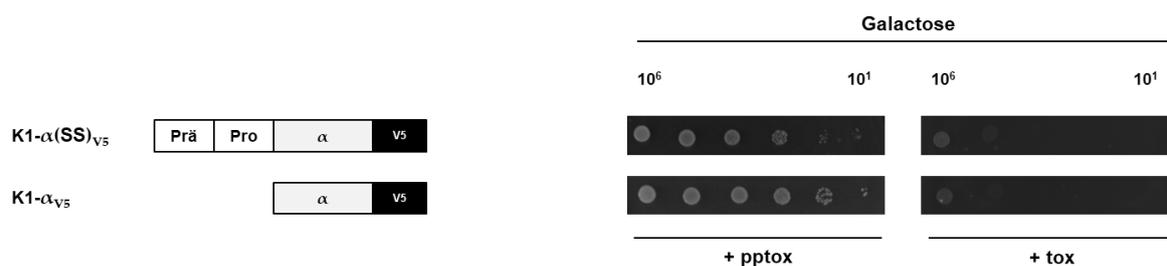


Abbildung 30: Co-Expression von Letalkonstrukten mit C-terminalem V5-Tag führt zur Ausbildung einer funktionellen Immunität. Zellen des sensitiven Stammes BY4742 wurden mit wildtypischem K1-pptox (links) bzw. der verkürzten Version ohne Präpro-Region (K1-tox, rechts) und den angegebenen α_{V5} -Derivaten transformiert. 10^6 - 10^1 Zellen der Transformanten wurden in logarithmischen Verdünnungen Galactose-haltige Ura/Leu d/o-Agarplatten (induzierte Kondition) aufgetropft. Das Wachstum der Kolonien wurden nach Inkubation (3 d, 30 °C) dokumentiert und repräsentative Ergebnisse sind dargestellt (n = 15).

Die Co-Transformation der V5-getaggteten α -Derivate mit einem wildtypischen K1-pptox zeigte keine signifikanten Einschränkungen in der Vermittlung der Immunität, wobei eine

leichte Wachstumseinschränkung für das α -V5-Konstrukt mit Präpro-Region gezeigt werden konnte (**Abb. 30**). Unter nicht induzierten Bedingungen (Glucose) konnte keine Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Auswirkung der Tags auf die Sekretion von biologisch aktivem Toxin bzw. die Vermittlung der Immunität wurde im Anschluss mittels MBA-Diffusionstests analysiert (**Abb. 31**).

							TOXIZITÄT		IMMUNITÄT
	Prä	Pro	α	V5	γ	β	Intakte Zellen	Sphäroplasten	
K1-pptox- α_{V5}				V5			-	-	-
K1-pptox- β_{FLAG}							-	-	+

Abbildung 31: Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung der C-terminal getaggten K1-Vollängentoxine. V5- bzw. Flag-Tags sind in Schwarz dargestellt. Untersucht wurden die Auswirkungen der Tags auf die Toxizität der K1-Vollängen-Derivate auf intakte bzw. sphäroplastierte Zellen des sensitiven Stammes BY4742 sowie auf die Ausbildung einer funktionellen Immunität gegen wildtypisches K1-Toxin. Ein wildtypischer Phänotyp ist durch (+) gekennzeichnet, der Verlust von Toxizität und Immunität ist durch (-) dargestellt.

Die Ergebnisse der MBA-Tests verdeutlichten, dass das Anfügen eines V5-Tags am C-Terminus der α -Untereinheit nicht nur zu einem vollständigen Verlust der biologischen Aktivität des K1-Toxins führte, sondern auch die Ausbildung des funktionellen Immunitätsmechanismus verhinderte (**Abb. 31**). Wurde die β -Untereinheit mit einem Flag-Tag markiert, führte dies ebenfalls zu einem Verlust der Toxizität, sowohl gegen intakte als auch gegen sphäroplastierte Zellen, allerdings blieben die Transformanten immun gegen extrazellulär appliziertes K1-Toxin. Zusätzlich zu den MBA-Diffusionstests wurden Western Analysen von zellfreien Überständen entsprechender Transformanten durchgeführt. Allerdings konnte weder für das V5- noch für das Flag-getaggte K1-Derivat ein Toxin-Heterodimer durch Tag-spezifische Antikörper detektiert werden. Beide K1-Vollängenkonstrukte wurden zudem in die Hefestämme BY4741 und SEY6210 transformiert, um Artefakte durch stammspezifische Sekretions- bzw. Prozessierungs-Unterschiede auszuschließen, allerdings konnte auch in Überständen dieser Hefen kein reifes K1-Dimer nachgewiesen werden; insgesamt schien die Toxinprozessierung im sekretorischen Weg durch das Anfügen der ausgewählten Tags deutlich gestört zu werden. Aus diesem Grund wurden Antikörper gegen die beiden Untereinheiten des Heterodimers, α und β , sowie gegen die γ -Untereinheit kommerziell durch die Firma GeneScript hergestellt

und auf ihre Immunogenität bzw. potentielle Kreuzreaktionen untersucht. Die Peptidsequenzen, die zur Antikörperproduktion verwendet wurden, können **Tabelle 9** entnommen werden und wurden aufgrund ihrer hohen Immunogenität zur Immunisierung eingesetzt. Erste Western Analysen unter Verwendung dieser Antikörper zeigten eine hohe Spezifität für die entsprechenden Untereinheiten, so dass sowohl sezernierte als intrazelluläre K1-Toxinuntereinheiten nachgewiesen werden konnten; basierend auf diesen Antikörpern ist somit eine Grundlage zum immunologischen Nachweis des K1-Toxins gegeben (**Abb. S1 und S2**, s. Anhang).

3.3. Zeitabhängige Transkriptomanalyse K1-sensitiver Zellen nach Toxinapplikation

Im Unterschied zu Zygotin, dessen ionophore Wirkung bereits innerhalb weniger Minuten nachweisbar ist, konnten die in dieser Arbeit durchgeführten FACS-Analysen demonstrieren, dass eine K1-induzierte Porenbildung erst nach längerer Inkubationszeit detektierbar ist und zudem nicht direkt mit dem Absterben der Zelle korreliert. Diese zeitverzögerte Wirkung impliziert einen komplexen Wirkmechanismus, in dem auch potentielle Abwehrreaktionen der sensitiven Zelle eine Rolle spielen könnten. Im Folgenden wurde basierend auf diesen Beobachtungen eine RNA-Seq-Analyse eines sensitiven Stammes nach Toxin-Applikation durchgeführt. Eine solche Sequenzierung des Transkriptoms ermöglicht den Nachweis bzw. die Quantifizierung der gesamten mRNA in der ausgewählten biologischen Probe, um im Anschluss Aussagen über die differentielle Regulation unterschiedlicher Gene treffen zu können.

In diesem Versuchsansatz wurden wildtypische Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes BY4742 mit K1-Toxin über einen Zeitraum von zwei Stunden inkubiert. Da in vorangegangenen Untersuchungen die Verwendung von JG-Medium die höchste Stabilisierung des Toxins erbrachte, wurde dieses Medium zur Toxinproduktion genutzt. Die biologische Aktivität des verwendeten K1-Konzentrates wurde mittels MBA überprüft, wobei eine finale Konzentration von 1.000 AU zur Applikation gewählt wurde. Diese hohe Toxinkonzentration schloss die Induktion einer Apoptosereaktion in den sensitiven Zellen aus, welche durch Einsatz niedriger Mengen unterschiedlicher Killertoxine bereits gezeigt werden konnte (Reiter *et al.*, 2005). Die Entnahme der Proben zur RNA-Isolierung erfolgte 2, 10, 30, 60 und 120 Minuten nach Zugabe des K1-Toxins; sämtliche Änderungen im Transkriptom wurden auf eine unbehandelte Kontrolle normiert, welche unmittelbar vor

Toxinzugabe präpariert wurde. Zur statistischen Analyse wurden die Probenentnahme und folglich die Isolation der RNA für jeden gewählten Zeitpunkt in technischen Triplikaten durchgeführt. Nach der Illumina-Sequenzierung, welche am Lehrstuhl für Genetik/Epigenetik (Prof. Walter, UdS) durchgeführt wurde, erfolgte eine Aufbereitung der generierten Reads aller Proben. Die Rohdaten wurden im Archiv des *European Nucleotide Archive* (ENA) unter der *Accession Number* PRJEB28672 hinterlegt.

Die weitere bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Marcel Schulz (MPI, UdS; Institut für Kardiovaskuläre Regeneration, Universität Frankfurt). Zur Quantifizierung der Genexpression wurden die Daten jedes Replikates unter Verwendung der Software *Salmon* (v0.8.2) auf das Referenzgenom des Hefestamms *S. cerevisiae* S288C gemappt (Readzahl, s. Gier *et al.*, 2019a, Supplementary Table S1). Hierbei handelt es sich um den parental Stamm der verwendeten sensitiven Hefe BY4742, so dass Unterschiede in den Genomsequenzen lediglich einige wenige Stoffwechselgene betreffen (Brachmann *et al.*, 1998). Nach Berechnung der *Transcripts per Million* (TPM) - Werte wurden die differentiell exprimierten Gene (*Differentially Expressed Genes*, DEG) bestimmt, von denen über alle Zeitpunkte insgesamt 1189 signifikant reguliert waren (p_{adj} -Wert < 0,01). Von diesen Genen waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 478 hochreguliert und 705 herunterreguliert, lediglich neun Gene zeigten fluktuierende *Fold Changes*, d. h. sowohl negative als auch positive Regulation über den Zeitverlauf. Zur weiteren Analyse wurden die signifikanten DEG weiter in frühe (*Early*, 2 und 10 min), intermediäre (*Intermediate*, 30 und 60 min) und späte (*Late*, 120 min) transkriptionelle Antworten eingeteilt. Im Fall der hochregulierten DEG konnten 99 Gene als frühe Responder, 139 als intermediäre und 404 als späte Responder klassifiziert werden. Im Gegensatz zu diesem graduellen Anstieg konnten für die DEG mit negativem *Fold Change* 200 Gene als frühe und 176 Gene als intermediäre Responder eingeteilt werden, die meisten Gene (622) fanden sich allerdings unter den spät herunterregulierten DEG (vollständige Liste aller DEG s. Gier *et al.*, 2019a, Supplementary Table S2). Da viele Gene zu mehreren Zeitpunkten signifikant de-reguliert waren, wurden diese DEG in mehreren Clustern berücksichtigt, so dass die Summe der Gene die Gesamtanzahl signifikanter DEG übersteigt (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Clustering der signifikanten DEG in Abhängigkeit vom *Fold Change* und der Zeit

	POSITIVE REGULATION	NEGATIVE REGULATION
Total	487	705
EARLY	99	200
INTERMEDIATE	139	176
LATE	404	622

Für jedes Cluster wurde ein *Gene Ontology* (GO) *Enrichment* unter Verwendung des Browser-basierten Tools *Gorilla* durchgeführt. Die resultierende Auflistung der GO-Terme wurde mit Hilfe von *Revigo* zusammengefasst und visualisiert, wobei lediglich signifikant angereicherte GO-Terme berücksichtigt wurden (*FDR-corrected q-value* < 0,01). Die Darstellungsweise berücksichtigt sowohl die statistische Signifikanz (Farbe und Größe der Sphären), als auch die Ähnlichkeit der GO-Terme untereinander (*Semantic Space Y*), (**Abb. 32**). Zu allen untersuchten Zeitclustern wurden GO-Terme gefunden, die auf eine Hochregulation des Kohlenstoffmetabolismus hindeuten (**Abb. 32**, links). Insbesondere zu frühen Zeitpunkten, d. h. nach kurzer Inkubationszeit mit dem Killertoxin, konnten diverse Gene des Hexose-Metabolismus und des Transmembrantransports signifikant angereichert werden; zu diesen gehören u. a. die Gene der Glycogen-Synthasen *GSY1* und *GSY2*, der Glukokinase *GLK1* sowie mehrere Gene, die für *High-Affinity* Hexose-Transporter codieren. Der biologische Prozess *Hydrogen Ion Transmembrane Transport* umfasst Gene für mitochondriale Proteine (*ATP14*, *ATP15*, *COX8*, *PIC2*, *TIM11* etc.), während *Cell Ageing* Gene für die Transkriptionsfaktoren (TF) *Tec1p* bzw. *Msn4p*, die Superoxid-Dismutase *Sod2p*, die Nicotinamidase *Pnc1p* sowie die Thioredoxinperoxidase *Tsa1p* umfassen. Letztere wirkt als Antioxidans sowohl in Mitochondrien als auch im Cytoplasma und deutet zusammen mit der Hochregulierung von *SOD2* auf einen beginnenden Anstieg des zellulären oxidativen Stresslevels hin (**Abb. 32**, links/*Early*).

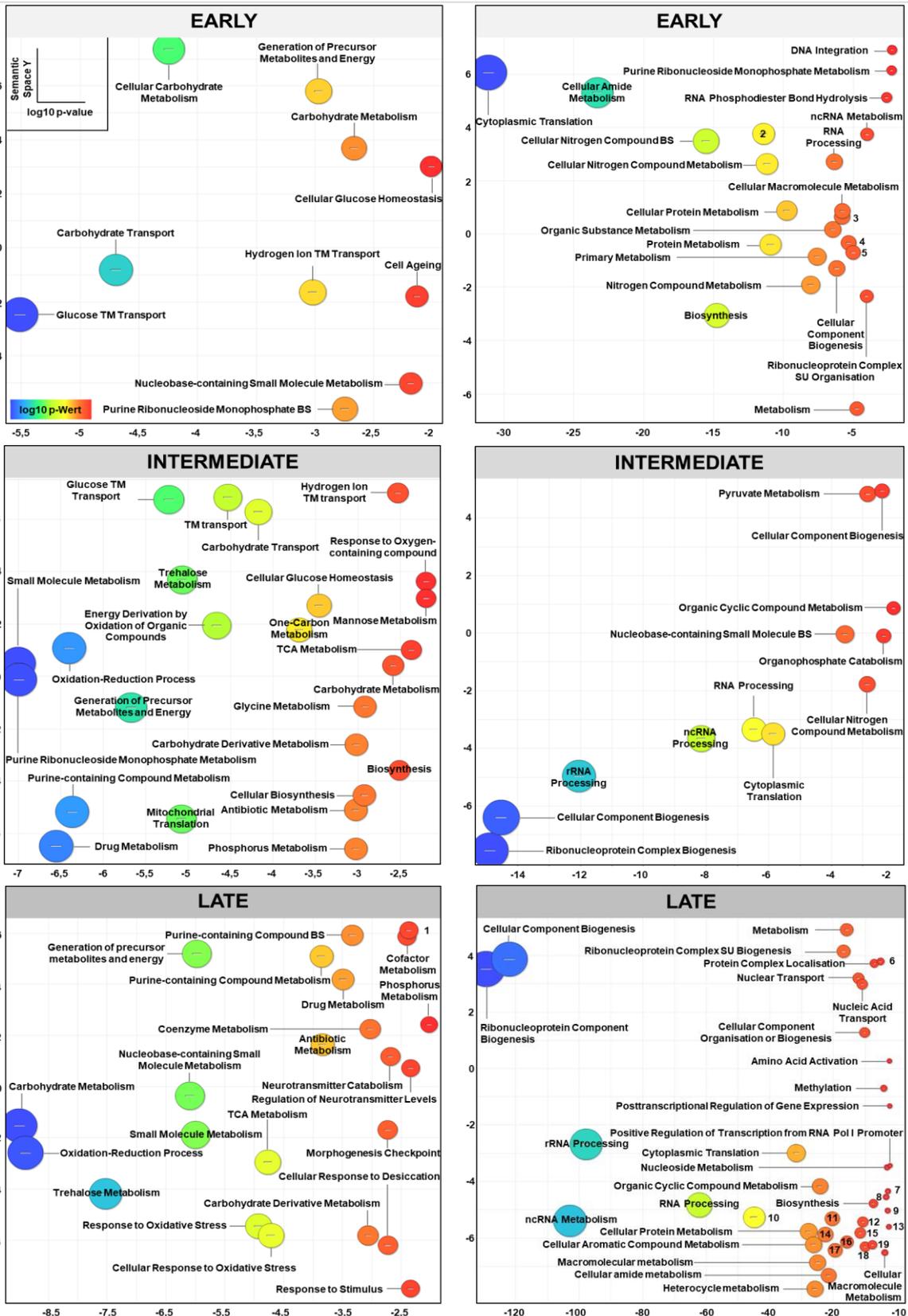


Abbildung 32: GO-Analyse der signifikant de-regulierten DEG in Abhängigkeit der Zeit nach K1-Zugabe. DEG ($p_{adj.} < 0,01$) wurden in frühe (t_2 und t_{10}), intermediäre (t_{30} und t_{60}) und späte (t_{120}) Responder eingeteilt und anhand ihres *Fold Changes* in hoch (**links**)- und herunterregulierte Gene (**rechts**) geclustert. Das *GO-Enrichment* wurde mit Hilfe der *Gorilla*-Software für jedes Datenset berechnet, die anschließende Visualisierung erfolgte mittels *Revigo* unter Verwendung der signifikant angereicherten GO-Terme (FDR-corrected q -value $< 0,01$). Fortsetzung nächste Seite.

Fortsetzung Abbildung 32: Die Darstellung der GO-Terme erfolgt anhand der berechneten Signifikanz (\log_{10} *p*-Wert, X-Achse) und des *Semantic Space Y* (Darstellung der relativen Ähnlichkeit der GO-Terme, Y-Achse). Die Farbe und Größe der Sphären korreliert mit dem \log_{10} *p*-Wert (Blau: höchste Signifikanz). **Links: Positiv-regulierte GO-Terme.** 1: *Pyridine-containing Compound Metabolism*. **Rechts: Negativ-regulierte GO-Terme.** 2: *Organonitrogen Compound Metabolism*, 3: *Ribonucleoprotein Complex Metabolism*, 4: *Cellular Metabolism*, 5: *Cellular Complex Biogenesis*, 6: *Cellular Process*, 7: *Transcription from RNA Polymerase (Pol) III Promoter*, 8: *Transcription from RNA Pol I Promoter*; 9: *Cellular Macromolecule Metabolism*, 10: *Cellular Nitrogen Compound Metabolism*, 11: *Organic Substance Metabolism*, 12: *Cellular Nitrogen Compound Biosynthesis*, 13: *Cellular Macromolecular Metabolism*, 14: *Primary Metabolism*; 15: *RNA Modification*, 16: *RNA Phosphodiester Bond Hydrolysis*, 17: *Cellular Metabolism*, 18: *Nucleic Acid Phosphodiester Bond Hydrolysis*, 19: *RNA Methylation* (Abbildung entnommen aus Gier *et al.*, 2019a).

Positiv regulierte biologische Prozesse nach 30 und 60 minütiger Inkubation mit K1-Toxin umfassen die bereits zu frühen Zeitpunkten hochregulierten GO-Terme *Carbohydrate Metabolism* und *Trehalose Metabolism* (**Abb. 32**, links/*Intermediate*). Ebenso wurde ein *Enrichment* für den biologischen Prozess *Mitochondrial Translation*, welcher insgesamt 15 mitochondriale Gene abdeckt (z. B. *MNP1*, *MRPL23*, *MRPL13*, *MRPL1*, *MRPL3*, *MRSP12*), berechnet sowie für *Metabolism of Purine-containing Compounds*, welcher die meisten Gene der *de novo* IMP-Synthese (*ADE1*, *ADE4*, *ADE12*, *ADE13*, *ADE17*) umfasst. Als weitere zelluläre Adaptationen auf Transkriptom-Ebene in diesem Zeitcluster konnte die Hochregulierung von sechs Genen (*IDH1*, *IDH2*, *LSC2*, *SDH3*, *SDH4*, und *CIT1*) des Citratzyklus (*TCA Cycle*) beobachtet werden sowie das *Enrichment* von positiv regulierten Genen, die in den GO-Termen *Drug Metabolism* und *Antibiotic Metabolism* zusammengefasst werden können und welche ebenfalls viele Gene des Citratzyklus und der oxidativen Stressantwort enthalten.

Das *Enrichment* der DEG nach 120 min Inkubation mit K1-Toxin zeigte ein ähnliches Profil wie die intermediären Responder, jedoch wurden einige biologische Prozesse zusätzlich positiv reguliert, welche vor allem mit diversen zellulären Stressreaktionen zusammenhängen (**Abb. 32**, links/*Late*). Diese GO-Terme umfassen die Gene *TPS1*, *TPS2*, *PGM2*, *TSL1*, *UGP1* *ATH1*, *NTH1* und *NTH2*, deren Genprodukte hauptsächlich für den Metabolismus des Osmolyts Trehalose erforderlich sind (*Trehalose Metabolism* und *Cellular Reaction to Desiccation*) sowie die Gene *MXR2*, *GRX1*, *GRE3*, *CTT1*, *HYR1*, *PRX1* und *ZTA1*, welche für essentielle Proteine zur zellulären Antwort auf oxidativen Stress codieren; zusätzlich wurden Gene hochreguliert, welche für verschiedene Multi-Stress-regulierende Proteine codieren (*XBPI*, *MSH2*, *MSH6* und *DDR2*). Die ebenfalls angereicherten GO-Terme *Neurotransmitter Catabolism* und *Regulation of Neurotransmitter Level* umfassen die Gene *GCV1*, *GCV2* und *GCV3*, die für alle drei Untereinheiten des mitochondrialen Glycin-Decarboxylase-Komplexes codieren sowie das

Glycin-Hydroxymethyltransferase-codierende Gen *SHM2*, dessen Genprodukt die Umwandlung von Serin zu Glycin katalysiert (**Abb. 32**, links/*Late*). Zusätzlich wurden die Gene mehrerer *Heat Shock*-Proteine positiv reguliert, wobei die höchsten *Fold Changes* für *HSP12*, *HSP26* und *HSP42* mit Werten von 1,8, 1,4 bzw. 1,2 beobachtet werden konnten. Der GO-Term *Morphogenesis Checkpoint* umfasst die Gene *SWE1*, *GIN4*, *HSL1* und *KCC4*, deren Hochregulation auf eine Veränderung der Zellform und der Zellwandintegrität hindeutet.

Im Fall der negativ regulierten DEG, d. h. der Gene, deren mRNA-Level nach K1-Zugabe im Vergleich zur Kontrolle abnahm, konnten direkt zu frühen Zeitpunkten die GO-Terme *Cytoplasmic Translation* und *RNA Processing* angereichert werden (**Abb. 32**, rechts/*Early*). Mehrere Gene, die für ribosomale Strukturproteine codieren, einschließlich der beiden Ribosomen-Untereinheiten (UE), waren herunterreguliert; darüber hinaus wurden GO-Terme angereichert, die eine Rolle in der RNA-Prozessierung spielen (einschließlich *ncRNA*- und *rRNA Processing*). Der negativ regulierte Term *DNA Integration* umfasst acht Gene von herunterregulierten Retrotransposons. Insgesamt konnten 24 Retrotransposons (Ty-Gene) identifiziert werden, welche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant de-reguliert waren. Über alle untersuchten Zeitcluster waren hiervon sieben hochreguliert, wohingegen die meisten negativ reguliert waren; unabhängig davon zeigten die retrotransposablen Elemente sehr hohe *Fold Changes* von ca. 6 bis 10 (siehe Gier *et al.*, 2019a, Supplementary Table S2).

Das GO-*Enrichment* der zu intermediären Zeitpunkten negativ regulierten Gene zeigte eine leichte Reduktion der Anzahl der berechneten GO-Terme, was sich auch in den geringeren \log_{10} *p*-Werten widerspiegelt. Die Terme *Component Biogenesis* und *Ribonucleic Acid Complex*, welche die Ribosomen-Biogenese und -Assemblierung umschreiben, wiesen hierbei dennoch eine hoch signifikante Anreicherung auf, gefolgt von den GO-Termen *ncRNA*- und *rRNA Processing* (**Abb. 32**, rechts/*Intermediate*).

Für die spät-herunterregulierten DEG zeigte das *Enrichment* vor allem GO-Terme auf, die sich allgemein auf Prozesse der Genexpression, einschließlich Transkription und Translation, beziehen. Die meisten DEG konnten zudem in GO-Terme eingeordnet werden, welche die Ribosomenbiosynthese, -arrangement und -assemblierung, beschreiben (*Ribonucleoprotein Component Biogenesis* und *Cellular Component Biogenesis*). Des Weiteren wurden die GO-Terme *Regulation of Transcription from RNA Polymerase I/III* und *Cytoplasmic Translation* signifikant angereichert, welche beispielsweise die Gene *RPC10*, *RPC19*, *RPA4*, und *RPB5* umfassen (**Abb. 32**, rechts/*Late*).

Basierend auf früheren Studien, die einen Verlust von zellulären Metaboliten wie beispielsweise ATP beobachteten, sowie zur Validierung der Transkriptomdaten wurden die intra- und extrazellulären ATP-Konzentrationen bestimmt (de la Pena *et al.*, 1980). Hierzu erfolgte eine Metabolitenextraktion der Proben, die auch für die zeitliche Korrelation der Lebendzellzahl und der K1-induzierten Porenbildung genutzt wurden (**Abb. 33**). Da die Daten ebenfalls eine negative Regulation unterschiedlicher Gene des Glycerol-Metabolismus implizierten, wurde zudem die Konzentration dieses Metabolits bestimmt.

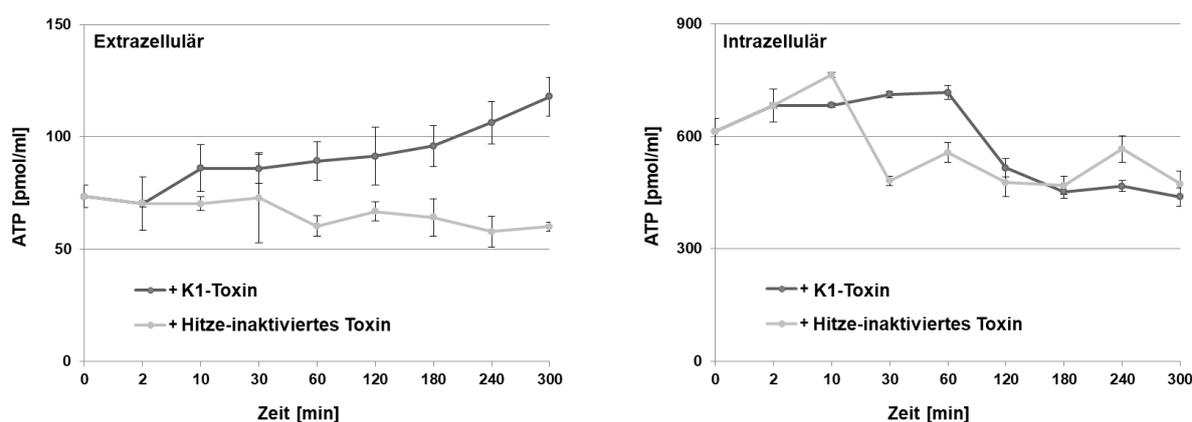


Abbildung 33: Vergleich intra- und extrazellulärer ATP-Level nach K1-Applikation. BY4742 wurde in JG-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert. Nach Zugabe von 1.000 AU K1 (Endkonzentration im Medium) wurden über einen Zeitraum von 5 h Proben zur Metabolitenextraktion entnommen. Zur Kontrolle wurden Zellen mit Hitze-inaktiviertem K1-Toxin (15 min, 100 °C) versetzt. Direkt nach Entnahme erfolgte ein Quenching der Proben in 60 % Methanol (-40 °C); nach Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm, -10 °C) wurde der Überstand lyophilisiert (extrazellulär) und das verbleibende Zellpellet mittels Glasperlen und Zugabe von Methanol-Chloroform aufgeschlossen (intrazellulär). Die Bestimmung der ATP-Level [pmol/ml] erfolgte mittels Luciferase-Aktivität, wobei die resultierende Lumineszenz über eine Integrationszeit von 1.000 ms gemessen wurde (verändert nach Gier *et al.*, 2019a).

Die intra- und extrazelluläre Konzentration von Glycerol lag für alle untersuchten Zeitpunkte zwischen 30-35 mmol/ml, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Toxin-behandelten Zellen und den entsprechenden Kontrollproben des Hitze-inaktivierten K1-Konzentrates beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Messungen des extrazellulären ATP-Gehalts zeigten hingegen einen deutlichen und stetigen Anstieg dieses Metabolits nach Zugabe von K1, welcher in der Kontrolle nicht verzeichnet werden konnte und zudem den bereits in der Literatur beschriebenen konstanten Verlust an zellulärem ATP bestätigt (**Abb. 33, links**). Im Gegensatz hierzu blieben die intrazellulären ATP-Level relativ konstant bis ca. eine Stunde nach K1-Applikation, woraufhin ein deutlicher Abfall der ATP-Konzentration detektiert werden konnte (**Abb. 33, rechts**). In den Proben, die mit inaktivem K1-Toxin inkubiert wurden, konnte dieser deutliche Abfall nicht beobachtet

werden und es wurden bis auf die anfänglich hohen ATP-Level relativ konstante Konzentrationen dieses Metabolits über den untersuchten Zeitraum gemessen.

Zum weiteren Clustering und zur Visualisierung der erhaltenen zeitabhängigen Genexpressionsdatensätze wurde die Java-basierte Programmapplikation *Dynamic Regulatory Events Miner* (DREM) verwendet. Dieses Tool analysiert gegebene Datensätze in Abhängigkeit von TF-Gen-Interaktionen und berechnet ein dynamisches regulatorisches Netzwerk, mit dessen Hilfe unterschiedliche GO-Term-Cluster innerhalb der Expressionsdaten graphisch visualisiert werden können. Zusätzlich werden jedem Zeitpunkt, an dem sich GO-Terme aufgaben, basierend auf vorhandenen Literaturdaten Transkriptionsfaktoren zugeordnet, die potentiell für diese Aufspaltung verantwortlich sein könnten. Nach Berechnung des TPM-Mittelwerts der entsprechenden Triplikate zu jedem Zeitpunkt wurden diese Daten als Input-Matrix für DREM verwendet. Da zuvor bereits beobachtet wurde, dass signifikante DEG meist einen *Fold Change* von über 0,3 besitzen, wurde die minimale absolute Expressionsänderung (*Minimum Absolute Expression Change* < 0,3) in den Settings so gewählt, dass möglichst wenig insignifikante Gene in die Berechnung mit einbezogen werden. Auf diese Weise wurde ein dynamisches Netzwerk mit insgesamt elf Hauptverzweigungen generiert (**Abb. 34**).

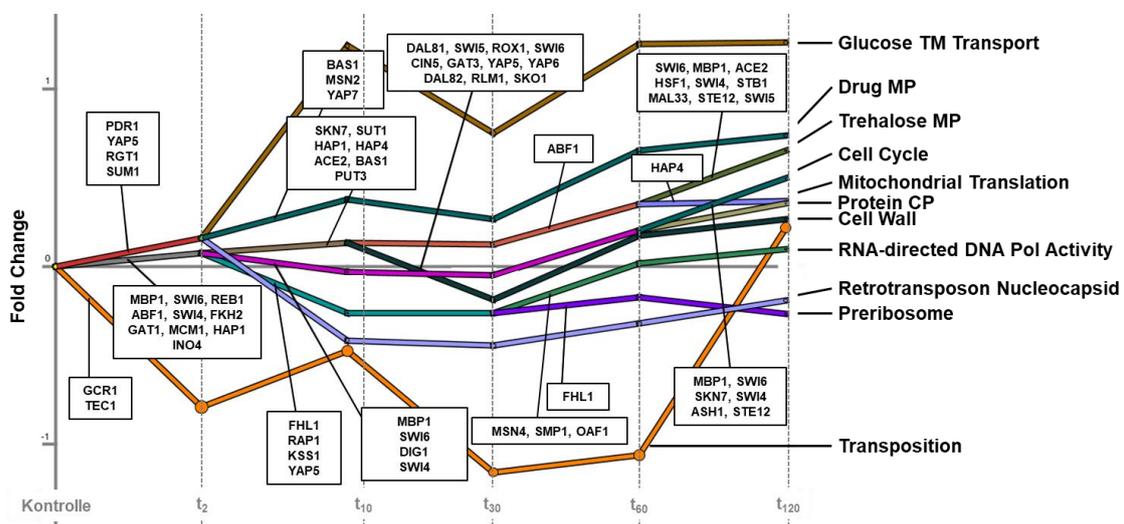


Abbildung 34: DREM-Analyse der Transkriptomdaten des Stammes BY4742 nach K1-Applikation. Das dargestellte Diagramm wurde unter Verwendung der Java-Applikation DREM (*Dynamic Regulatory Events Miner*) angefertigt und stellt die Expressionsdaten als eine Funktion von Transkriptionsfaktor-Gen-Interaktionen in Abhängigkeit der Zeit dar. Illustriert ist ein dynamisches Netzwerk mit den zugehörigen TF ($p < 0,01$) für die entsprechenden Gabelungen der angezeigten GO-Terme. Das *Fold Enrichment* und die korrespondierenden p-Werte aller GO-Terme sind in **Tabelle 12** aufgeführt. TM: *Transmembrane*, MP: *Metabolic Process*, CP: *Catabolic Process* (Abbildung entnommen aus Gier *et al.*, 2019a).

Die GO-Annotationen und das *Fold Enrichment* für die einzelnen Gabelungen sind in **Tabelle 12** zusammen mit den zugeordneten TF dargestellt. Der p-Wert ($p\text{-value}_{\text{corr.}}$) gibt hierbei die statistische Signifikanz des GO-Enrichments an, wobei zur Vollständigkeit auch insignifikante GO-Terme aufgelistet wurden. Nach zweiminütiger Inkubation mit K1-Toxin konnte die Gesamtheit der signifikanten DEG in die drei GO-Terme *Transposition* (orange), *Mitochondrial Translation* (grau) und *Glucose TM Transport* (rot) eingeteilt werden (**Abb. 34**). Die beiden letzteren gabelten sich nach zwei Minuten erneut in jeweils drei weitere Datencluster auf, wobei *Glucose TM Transport* (braun) nach zehn Minuten nicht mehr signifikant angereichert werden konnte. Nach 10-minütiger Inkubationszeit teilte sich der Pfad des GO-Terms *Mitochondrial Translation* erneut in drei separate GO-Terme auf. Hierbei bildete sich der Zweig *Cell Wall* (dunkelgrün), welcher nach 60 min in der Gabelung *Trehalose Metabolic Process* (olivgrün) mündete.

Tabelle 12: GO-Terme mit zugeordneten TF nach Analyse mit DREM. Dargestellt sind die übergeordneten *Gene Ontology*-Terme mit korrespondierendem *Fold Enrichment* (F. E.) und zugehörigen p -Werten ($p_{\text{corr.}}$). Der *Threshold* zur Zuordnung der TF wurde auf $p < 0,01$ gesetzt. Die Transkriptomdaten wurden auf eine signifikante De-Regulation jedes dargestellten TF überprüft. Insgesamt waren neun TF signifikant de-reguliert (**Abb. 35**). CP: *Catabolic Process*, MP: *Metabolic Process*, Pol: *Polymerase*, TM: *Transmembrane Transport* (verändert nach Gier *et al.*, 2019a).

GENE ONTOLOGY TERM	F.E.	$p_{\text{corr.}}$	TRANSKRIPTIONSFAKTOR
Glucose TM Transport	3,9	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>PDR1, YAP5, RGT1, SUM1</i>
Glucose TM Transport (nach t_{10})	9,5	0,7	
Drug MP	2,3	$3,4 \times 10^{-2}$	<i>BAS1, MSN2, YAP7</i>
Trehalose MP	17,6	$2,0 \times 10^{-3}$	<i>SWI6, MBP1, ACE2, HSF1, SWI4, STB1, MAL33, STE12, SWI5</i>
Cell Cycle	1,9	$1,8 \times 10^{-11}$	<i>MBP1, SWI6, DIG1, SWI4</i>
Cell Cycle (nach t_{60})	3,2	$1,7 \times 10^{-12}$	<i>MBP1, SWI6, SKN7, SWI4, ASH1, STE12</i>
Mitochondrial Translation	5,6	$1,5 \times 10^{-31}$	<i>MBP1, SWI6, REB1, ABF1, SWI4, FKH2, GAT, McM1, HAP1, INO4</i>
Mitochondrial Translation (t_2 - t_{10})	3,6	$2,3 \times 10^{-21}$	<i>SKN7, SUT1, HAP1, HAP4, ACE2, BAS1, PUT3</i>
Mitochondrial Translation (t_{30} - t_{120})	5,6	$1,5 \times 10^{-31}$	<i>ABF1, HAP4</i>
Protein CP	2,4	$6,0 \times 10^{-5}$	
Cell Wall	3,2	1,0	<i>DAL81, SWI5, ROX1</i>
RNA-directed DNA Pol Activity (t_2)	2,6	$3,6 \times 10^{-17}$	<i>FHL1, RAPI, KSSI, YAP5</i>
RNA-directed DNA Pol Activity (t_{30})	4,7	$9,0 \times 10^{-3}$	<i>MSN4, SMP1, OAF1</i>
Retrotransposon Nucleocapsid	2,3	1,0	
Preribosome	6,4	$2,8 \times 10^{-32}$	<i>FHL1</i>
Transposition	22,4	$3,7 \times 10^{-19}$	<i>GCRI, TEC1</i>

Jedem Pfad wurden entsprechende TF zugeordnet, welchen potentiell eine Beteiligung an der Aufspaltung der DEG zugeschrieben werden kann (**Tabelle 12**). Im Anschluss wurde das Expressionsprofil der insgesamt 66 zugeteilten TF überprüft, wobei für neun Transkriptionsfaktoren eine signifikante differentielle Expression festgestellt werden konnte (**Abb. 35**).

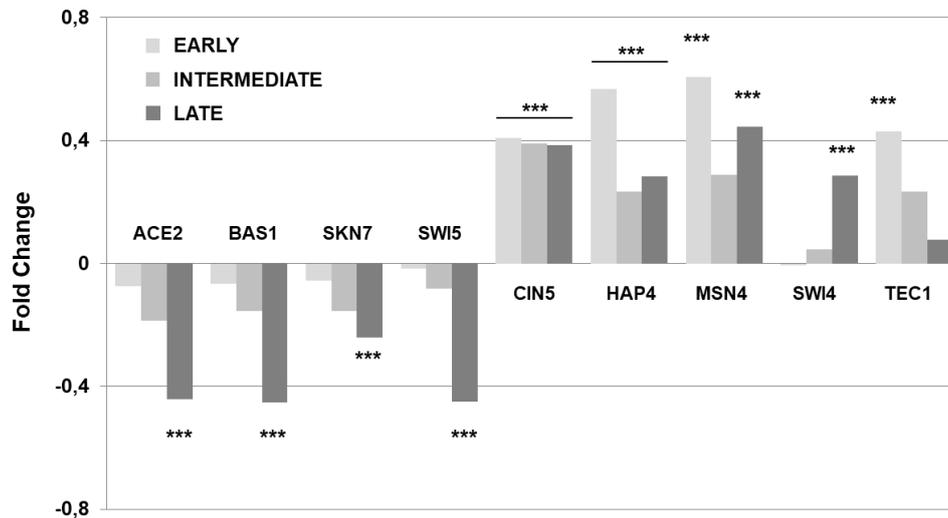


Abbildung 35: Signifikant veränderte Transkriptionsfaktoren nach Berechnung durch DREM. Transkriptionsfaktoren (TF), die mittels DREM bestimmten GO-Termen innerhalb der Expressionsdaten zugeordnet werden konnten, wurden auf signifikante De-Regulation überprüft. Dargestellt ist der jeweilige *Fold Change* der signifikant herunterregulierten (**links**) bzw. hochregulierten (**rechts**) TF für die Zeitcluster *Early* (hellgrau), *Intermediate* (grau) und *Late* (dunkelgrau). Signifikanz ist durch Sterne gekennzeichnet (***: $p_{adj.} < 0,01$), (verändert nach Gier *et al.*, 2019a)

Im Vergleich zur Kontrolle, d. h. Hefezellen vor Toxinzugabe, zeigten die Gene *ACE2*, *BAS1*, *SKN7* und *SWI5* einen negativen *Fold Change* über alle untersuchten Zeitpunkte, wobei diese Änderung des zellulären Transkriptionsprofils erst im späten Zeitcluster (*Late*) signifikant wurde (**Abb. 35, links**). Im Gegensatz hierzu war der positive *Fold Change* der Gene *CIN5* und *HAP4* zu allen Zeitpunkten signifikant, während *MSN4* für frühe (*Early*) und späte (*Late*) Inkubationszeiten signifikant hochreguliert wurde. Das Transkriptionsprofil von *SWI4* und *TEC1* wies zu späten bzw. frühen Zeitpunkten eine signifikante Hochregulierung auf (**Abb. 35, rechts**).

Neben einer zeitabhängigen Analyse der RNA-Seq-Daten wurde zusätzlich gezielt das Transkriptionsprofil von Genen, deren De-Regulation einen Einfluss auf die toxische Wirkung des K1-Toxins haben könnte, analysiert. Hierzu wurden besonders Gene, deren Produkte in den Lipidstoffwechsel involviert sind oder für Ionenkanäle der Plasmamembran codieren (wie *ENA1*, *TRK1* und *TRK2*), betrachtet. Besonders die aktive Regulation von

unterschiedlichen Ionenkanälen könnte eine essentielle Rolle in der Osmoprotektion der Zelle spielen, indem beispielsweise Protonen verstärkt aus dem Cytoplasma transportiert werden. Allerdings zeigte lediglich das Gen der H⁺-ATPase *Pma1p* eine signifikante differentielle Regulation. Diese ATPase reguliert durch den Energie-abhängigen Protonentransport über die Plasmamembran nicht nur den cytoplasmatischen pH-Wert, sondern hält auch den Transmembrangradienten und somit die protonenmotorische Kraft aufrecht. Zusätzlich wiesen auch die Gene *PMP1* und *PMP2*, welche für *Pma1p*-regulatorische Proteine codieren, eine signifikante negative Regulation auf. Außerdem zeigten die Transkriptomdaten eine signifikante negative Regulation der Gene mehrerer *Multi-Drug-Transporter* wie beispielweise *PDR5* und *PDR12*. Diverse Gene des Lipidmetabolismus wiesen vor allem zu intermediären und späten Zeitpunkten eine signifikante Veränderung ihres Transkriptionsprofils auf. Während beispielsweise *YDC1*, *SHM2*, *FAA1*, *CHO1*, *TGL1*, *ERG25*, *MCR1* und *OLE1* nach K1-Inkubation positiv reguliert vorlagen, zeigten die Gene *EEB1*, *ERG6*, *FAA4* und *AKR1* eine negative Regulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (s. Gier *et al.*, 2019a; Supplementary Table S2).

Zur Validierung der Ergebnisse der Transkriptomanalyse und der bisherigen Hypothesen zur toxischen Wirkung des Killertoxins wurden im Folgenden ausgewählte Mutanten auf ihre K1-Sensitivität nach Zugabe von extrazellulärem Toxin untersucht. Hierzu wurden haploide Nullmutanten (BY4741 oder BY4742-Hintergrund) von nicht essentiellen Genen und DAmP- (*Decreased Abundance by mRNA Perturbation*) bzw. diploide Hefen (BY4743) im Fall von essentiellen Genen mittels MBA-Diffusionstest untersucht. Eine vollständige Auflistung aller getesteten Mutanten kann **Tabelle 3** entnommen werden; insgesamt wurden 160 Deletionsmutanten untersucht. Zur graphischen Darstellung wurden die Mittelwerte der ausgemessenen Hemmhöfe auf den entsprechenden Wildtyp normiert. Illustriert sind lediglich Mutanten, deren Gendeletion eine potentielle Rolle in verschiedenen Aspekten der K1-Biologie haben könnte sowie Deletionsmutanten derjenigen Gene, die in der vorangegangenen Transkriptomanalyse besonders signifikant de-reguliert wurden (**Abb. 36**).

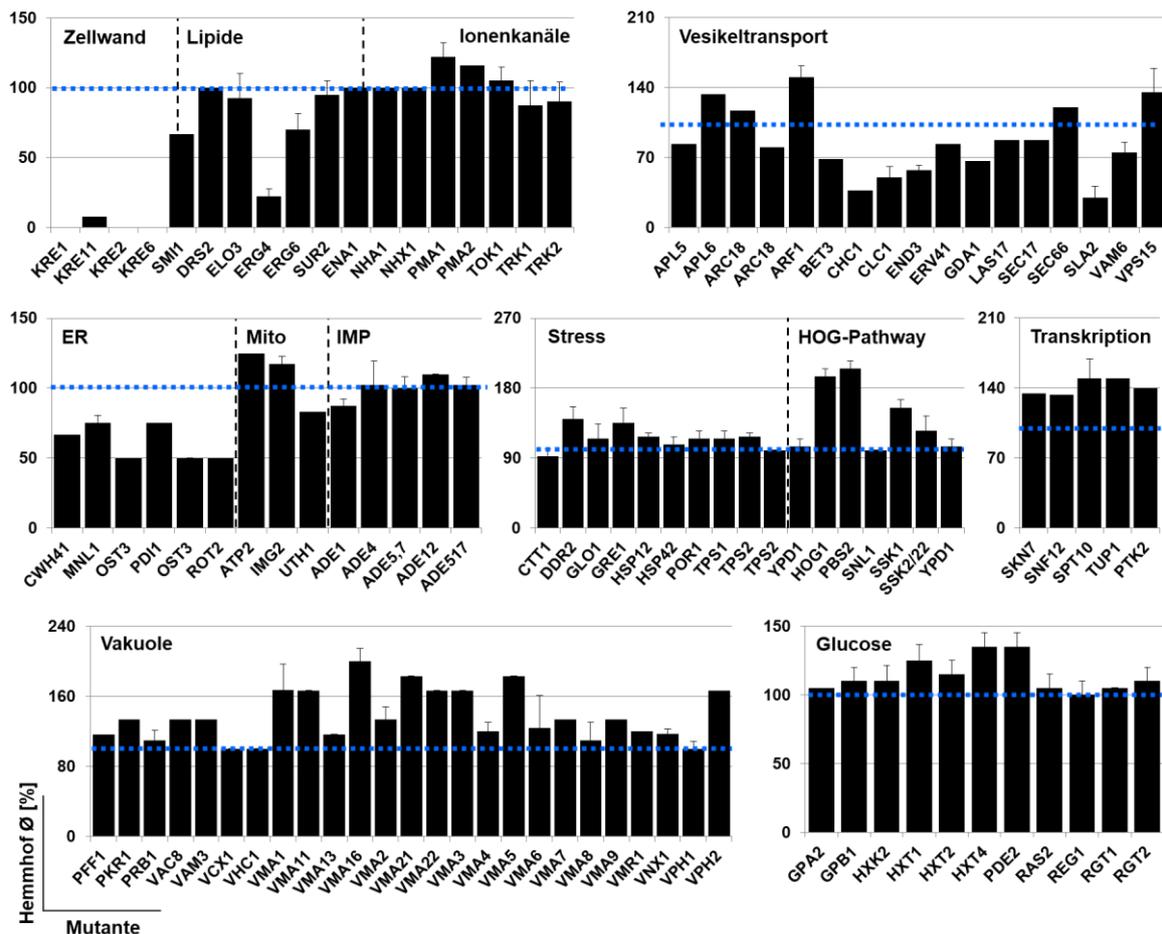


Abbildung 36: K1-Sensitivität ausgewählter Deletionsmutanten im Agar-Diffusionstest. Die Toxinsensitivität wurde mittels MBA-Diffusionstest analysiert. Hierzu wurden 10^6 Zellen der entsprechenden Mutanten in den SC-Glucose MBA (pH 4,7) eingebettet und 100 μ l K1-Konzentrat wurden appliziert. Hemmhofdurchmesser wurden nach einer Inkubation für 3 d bei 20 °C dokumentiert und auf den Wert des entsprechenden Wildtypstammes (BY4741, BY2742 bzw. BY4743) normiert (100 %, blaue Linie). Hyper- bzw. Hyposensitivität wurde als Hemmhofdurchmesser von 120 % bzw. 80 % definiert. Eine Übersicht aller untersuchten Deletionsmutanten kann **Tabelle 3** entnommen werden. Graphisch dargestellt sind lediglich die Mittelwerte ([%] \pm Stabw, n = 5) der Deletionsmutanten, deren Toxinsensitivität sich deutlich und reproduzierbar vom Wildtyp unterschied. Zusätzlich sind Nullmutanten illustriert, deren mRNA-Level in der Transkriptomanalyse des Stammes BY4742 deutlich de-reguliert war.

Die Auswertung der Toxinsensitivität der analysierten Deletionsmutanten validierte die deutlich ausgeprägte Resistenz von Mutanten unterschiedlicher Zellwandkomponenten wie *Δkre2*, *Δkre6* und *Δkre11* gegen extern appliziertes K1-Toxin, die bereits in vorangegangenen Studien deutlich wurden (Pagé *et al.*, 2003). Ebenso führte eine Deletion des K1-Sekundärrezeptors *Kre1p* zu einer vollständigen Toxinresistenz. Eine deutlich reduzierte Sensitivität im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp wurde für Mutanten beobachtet, deren Genprodukte eine Rolle im intrazellulären Vesikeltransport der Zelle oder der Endocytose spielen, wie beispielsweise *Δend3*, *Δsla2*, *Δclc1* und *Δchc1*. Ein ähnlicher Phänotyp wurde auch für Mutanten von ER-Proteinen oder Proteinen der Glycosylierung

(*Δost3*, *Δmnl1*) festgestellt, während eine Nullmutation in Genen verschiedener Ionenkanäle (u. a. *Δtok1*, *Δena1*, *Δtrk1*, *Δtrk2*) oder ausgewählter Gene des IMP-Metabolismus (*ADE*-Gene) keinen Phänotyp generierte, der sich signifikant von der Sensitivität des Wildtyps unterschied (**Abb. 36**). Ebenso führte auch die Deletion von Genen, die für Zellstressrelevante Proteine wie Tsl1p, Tps1p oder Ctt1p codieren, zu keiner erhöhten Toxinsensitivität, obwohl diese Gene in der Transkriptomanalyse signifikant hochreguliert waren. Ein hypersensitiver Phänotyp nach Applikation von extrazellulärem K1-Toxin wurde vor allem für Deletionsmutanten von Proteinen der Vakuole beobachtet, hierbei besonders für die Untereinheiten der V-ATPase (Vma1p, Vma2p usw.). Ein solcher Phänotyp mit deutlich gesteigerter Toxinsensitivität wurde auch in den Mutanten *Δimg2* und *Δatp2*, deren Gendeletion mitochondriale Proteine betrifft, detektiert. Deletionsmutanten von Proteinen des Glucose-Metabolismus, wie beispielsweise Arf1p, Hxt1p, Hxt4p oder Pde2p, zeigten ebenso wie die Nullmutanten der meisten Kinasen des HOG-Pathways (*Δhog1*, *Δpbs2*, *Δssk1*, *Δssk2/22*) eine deutliche Hypersensitivität nach Toxinzugabe, die sich in der Ausbildung von Hemmhöfen von nahezu doppelter Größe im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp äußerte (**Abb. 36**).

Wie bereits zuvor ausgeführt, besitzt die Verwendung von Deletionsmutanten zur Untersuchung der Toxinsensitivität bzw. -resistenz deutliche Limitierungen, da pleiotrope Effekte die Interpretation des beobachteten Phänotyps erschweren können. Dies spielt vor allem für Mutanten von Zellwandproteinen eine elementare Rolle, da durch deren Deletion die Zellwandzusammensetzung signifikant verändert vorliegt, so dass eine Interaktion von Toxinmolekülen und der Primärrezeptorfraction signifikant gestört wird. Der beobachtete resistente bzw. hyposensitive Phänotyp wäre demnach diesem Sekundäreffekt geschuldet. Aus diesem Grund wurden die bereits im MBA-Test untersuchten Mutanten mit den beschriebenen K1-Derivaten K1-pptox, K1- α , K1- α (SS), K1- $\alpha\gamma$ (SS), K1- $\alpha\gamma$ 39(SS) transformiert und potentielle Effekte nach intrazellulärer Expression wurden mittels seriellem Verdünnungstest analysiert. Nach Auswertung des Koloniewachstums konnte für die meisten untersuchten Mutanten kein distinkter Unterschied zum entsprechenden Wildtyp festgestellt werden. Ergebnisse von Deletionsmutanten mit einem reproduzierbaren und atypischen Phänotyp, d. h. abweichend vom entsprechenden Wildtyp, sind schematisch skizziert (**Abb. 37**). Die Expression der Letalkonstrukte K1- α und K1- α (SS) führte in allen getesteten Mutanten zur Induktion eines Selbstkillerphänotyps mit vollständiger Inhibition des Zellwachstums unter induzierten Bedingungen, wobei kein Unterschied zwischen diesen

beiden Konstrukten nachweisbar war; daher wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet. Zudem wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den exprimierten K1- $\alpha\gamma$ -Konstrukten (K1- $\alpha\gamma$ (SS) bzw. K1- $\alpha\gamma_{39}$ (SS)) festgestellt, so dass diese Ergebnisse zusammengefasst wurden. Zur Kontrolle wurde jede Mutante außerdem mit dem Leervektor pYES2.1 transformiert, wie erwartet wurde allerdings für keine der untersuchten Mutanten unter induzierten Bedingungen ein wachstumsinhibierender Effekt beobachtet.

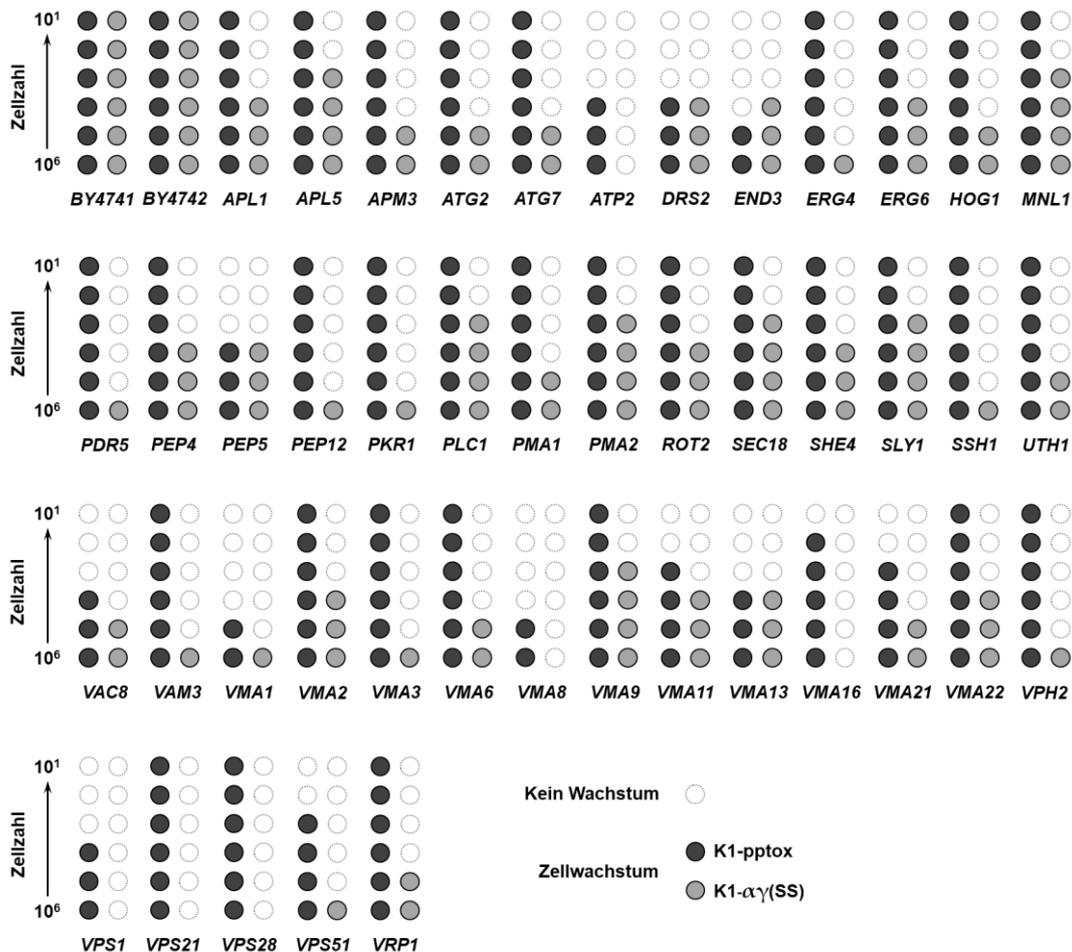


Abbildung 37: Schematische Zusammenfassung der atypischen Phänotypen nach intrazellulärer Expression unterschiedlicher K1-Derivate in ausgewählten Deletionsmutanten. Verschiedene Deletionsmutanten (Tabelle 3) wurden mit unterschiedlichen K1-Derivaten (K1-pptox, K1- α (SS), K1- α , K1- $\alpha\gamma$ (SS), K1- $\alpha\gamma_{39}$ (SS), Leervektor pYES2.1) transformiert. Die Transformanten wurden in logarithmischen Verdünnungen von 10^6 bis 10^1 Zellen auf Galactose-haltige Ura d/o-Agarplatten (induzierte Bedingungen) aufgetropft. Das Wachstum der Kolonien wurde nach 3 d Inkubation bei 30 °C dokumentiert, dargestellt ist eine schematische Visualisierung des Koloniewachstums unter induzierten Bedingungen (n = 3). Illustriert sind lediglich Ergebnisse von Deletionsmutanten, deren Wachstum sich nach Expression des K1-Volllängentoxins (K1-pptox, dunkelgrau) und des K1- $\alpha\gamma$ (SS)-Derivates (hellgrau) signifikant vom entsprechenden Wildtyp (BY4741, BY4742 bzw. BY4743) unterschied. Die Letalkonstrukte K1- α bzw. K1- α (SS) induzierten für jede untersuchte Mutante eine vollständige Inhibierung des Wachstums, während die Expression des Leervektors zu keiner Störung des Wachstums führte. Es konnte zudem kein deutlicher Unterschied zwischen den Derivaten K1- $\alpha\gamma$ (SS) und K1- $\alpha\gamma_{39}$ (SS) festgestellt werden, so dass zur Vereinfachung lediglich die Ergebnisse für K1- $\alpha\gamma$ (SS) dargestellt sind.

Die intrazelluläre Expression der Letalkonstrukte K1- α (SS) und K1- α führte in allen untersuchten Deletionsmutanten zu einer vollständigen Wachstumsinhibierung der Transformanten, so dass keine Mutation in der Lage war, die Induktion des Selbstkillerphänomens zu verhindern. Allerdings zeigten einige Mutationen deutliche Effekte auf die Ausbildung der intrinsischen Immunität, die bei wildtypischem Genomhintergrund durch die Expression des K1-Vorläufertoxins (K1-pptox) gewährleistet ist. Ebenso führten einige Deletionen zu deutlichen Einschränkungen in der Vermittlung der Immunität, die unter physiologischen Bedingungen durch die Expression von $\alpha\gamma$ -Derivaten gewährleistet wurden (**Abb. 37**). Deutlich hypersensitive Phänotypen konnten analog zu den Ergebnissen des zuvor durchgeführten MBA-Tests erneut in vielen Mutanten der V-ATPase beobachtet werden. So zeigten *$\Delta vma2$* , *$\Delta vma9$* , *$\Delta vma16$* und *$\Delta vma22$* sowie *$\Delta vph2$* deutliche Wachstumseinschränkungen bei Expression von $\alpha\gamma$ (SS) bzw. $\alpha\gamma39$ (SS) wohingegen die Expression des K1-Volllängentoxins Immunität verlieh. Im Fall der Mutanten *$\Delta vac8$* , *$\Delta vma1$* , *$\Delta vma8$* , *$\Delta vma11$* , *$\Delta vma13$* und *$\Delta vma21$* hingegen konnte diese Inhibierung des Wachstums bereits bei Expression des K1-pptox beobachtet werden, was auf eine Störung im Immunitätsmechanismus hindeutet. Ein ähnlicher Phänotyp konnte für *$\Delta vps1$* , *$\Delta atp2$* , *$\Delta drs2$* , *$\Delta pep5$* und *$\Delta vps51$* dokumentiert werden. Im Unterschied dazu wurde in einigen Mutanten nach Expression der K1- $\alpha\gamma$ -Derivate ein Wachstumsdefekt nachgewiesen, wohingegen die Expression des K1-Precursors zu keinem Absterben der Zellen führte.

Basierend auf unterschiedlichen Theorien, die dem Sekundärrezeptor Kre1p eine Rolle in der Vermittlung der Immunität zugeteilt hatten, wurde auch die entsprechende Nullmutante (BY4742 *$\Delta kre1$*) mit K1-Derivaten transformiert (Breinig *et al.*, 2002). Eine Untersuchung der potentiellen Effekte einer Deletion des K1-Sekundärrezeptors Kre1p gestaltet sich schwierig, da *$\Delta kre1$* -Mutanten bereits resistent auf Plasmamembranebene sind und weitere intrazelluläre Auswirkungen nicht untersucht werden konnten. Durch die intrazelluläre Expression der K1-Letalkonstrukte bzw. des K1-Volllängentoxins kann dieses Hindernis jedoch umgangen werden. Potentielle Auswirkungen der intrazellulären Expression dieser Konstrukte sind im Folgenden genauer beschrieben (**Abb. 38**).

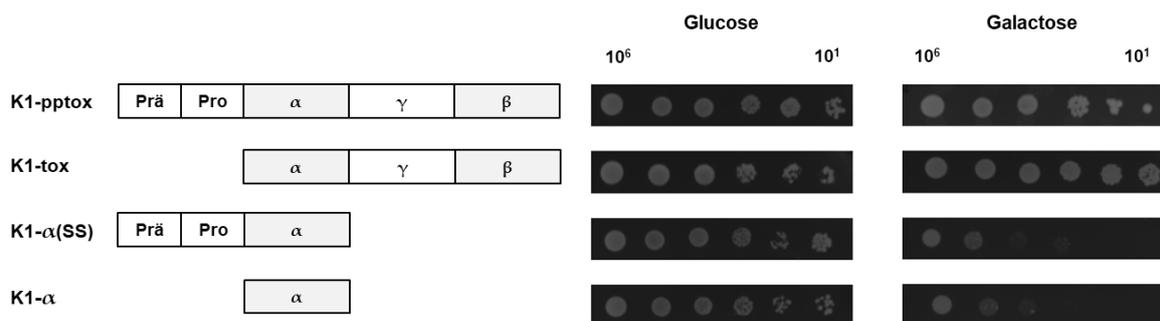


Abbildung 38: Induktion eines wildtypischen Phänotyps nach intrazellulärer Expression von K1-Derivaten im $\Delta kre1$ -Hintergrund. Zellen des Hefestammes BY4742 mit chromosomalem *Knock-out* von *KRE1* wurden mit den dargestellten K1-Derivaten transformiert. Über serielle Verdünnungstests wurde das Hefewachstum nach Expression der Konstrukte untersucht; hierzu wurden 10^6 - 10^1 Zellen der Transformanten auf Glucose-haltige (links, nicht-induzierte Bedingungen) bzw. Galactose-haltige Ura d/o Agarplatten (rechts, induzierte Bedingungen) aufgetropft. Das Wachstum der Zellen wurde nach Inkubation der Platten (3 d, 30 °C) dokumentiert, dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis (n = 5), (verändert nach Gier *et al.*, 2017).

Nach Expression des K1-pptox konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp beobachtet werden. Außerdem induzierten die Letalkonstrukte einen deutlichen Wachstumsdefekt, der analog zum wildtypischen Phänotyp ebenfalls nicht von der Präpro-Region abhängig war (**Abb. 38**). Im Folgenden wurde analysiert, inwiefern die Deletion des *KRE1*-Gens eine Auswirkung auf die Ausbildung der Immunität, die durch eine Co-Transformation mit dem K1-Precursor induziert wird; als Kontrolle diente eine verkürzte K1-Variante (K1-tox), (**Abb. 39**).

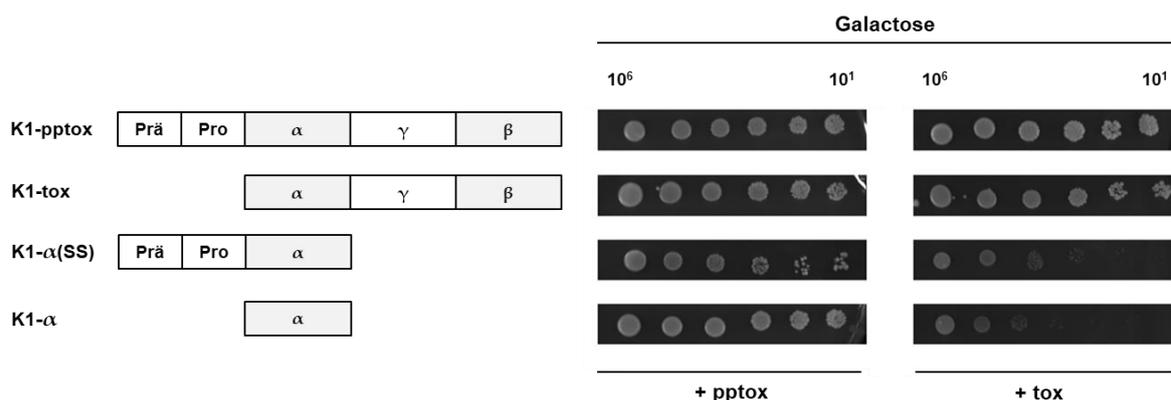


Abbildung 39: Co-Expression wildtypischer K1-Derivate im genomischen Hintergrund einer *KRE1*-Deletion führt zur Ausbildung einer funktionellen Immunität. Hefen mit Nullmutation von *KRE1* wurden mit den illustrierten K1-Derivaten und K1-pptox- (links) bzw. K1-tox-Derivaten (rechts) im Vektor pYX242 co-transformiert. 10^6 bis 10^1 Zellen der Transformanten wurden in logarithmischen Verdünnungen auf Galactose-haltige (induzierte Bedingungen) Ura/Leu d/o-Agarplatten aufgetropft. Die Auswertung des Wachstums erfolgte nach einer Inkubation für 3 d bei 30 °C; abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis (n = 5), (verändert nach Gier *et al.*, 2017).

Im Fall der Co-Transformationsexperimente konnte demonstriert werden, dass sich $\Delta kre1$ -Nullmutanten phänotypisch nicht vom entsprechenden Wildtyp unterschieden. Eine simultane Expression des K1-Volllängentoxins mit den K1-Letalkonstrukten führte zur vollständigen Vermittlung der Immunität, was sich im Wachstum der einzelnen Kolonien manifestierte. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrolle, bei der eine um die Präpro-Region verkürzte K1-Variante (K1-tox) co-exprimiert wurde, den erwarteten suizidalen Phänotyp (**Abb. 39**). Die analog durchgeführten Kontrollen unter nicht-induzierten Bedingungen (Glucose) zeigten keine Wachstumseinschränkungen der entsprechenden Transformanten auf (Daten nicht gezeigt).

Die Verwendung von Deletionsmutanten zur Untersuchung einer potentiell veränderte K1-Sensitivität konnte erneut die distinkte Toxinresistenz von Hefen mit Deletionen unterschiedlicher *KRE*-Gene aufzeigen (Pagé *et al.*, 2003). Es konnte außerdem eine deutlich verminderte Sensitivität von Mutanten mit Nullmutationen von Endocytose-relevanten Genen beobachtet werden. Die deutlichsten Phänotypen, die auch durch intrazelluläre Expression der K1-Derivate reproduziert werden konnten, zeigten Deletionsmutanten von Komponenten der vakuolären ATPase-Domänen V_1 und V_0 . Hierbei induzierte auch die intrazelluläre Expression des K1-Precursors in einigen Mutanten bestimmter Untereinheiten dieser Protonenpumpe einen Selbstkillerphänotyp. Neben den deutlich hypersensitiven Phänotypen konnte weiterhin die Beteiligung von Kre1p an der Vermittlung der Immunität durch Verwendung einer entsprechenden Nullmutante ausgeschlossen werden. $\Delta kre1$ -Mutanten verhielten sich sowohl nach Transformation mit K1-Derivaten als auch in Co-Expressionsexperimenten vollständig wie die entsprechende wildtypische Hefe.

3.4. Charakterisierung zellulärer Adaptationen in K1-Killerhefen

Neben der Analyse der Toxinwirkung auf sensitive Zellen, sollten potentielle Effekte des K1-Toxins auf Toxin-produzierende Zellen untersucht werden. Obwohl das Killerphänomen in Hefen weit verbreitet ist und die biologische Diversität unterschiedlicher Mikrohabitate elementar mitgestaltet, wurden Einflüsse der Toxinwirkung auf die Killerhefen selbst bisher kaum untersucht. Da sezerniertes Toxin erneut an Rezeptoren der Zellwand bzw. der Plasmamembran binden kann, können Adaptationen der Killerhefen, die sie über den

Immunitätsmechanismus des jeweiligen Toxins hinaus vor der letalen Wirkung schützen, nicht ausgeschlossen werden. Obwohl bisher unter *in vivo* Bedingungen kein extrazelluläres Stadium von Mykoviren nachgewiesen werden konnte, besteht die Möglichkeit, isolierte VLP mit Hilfe einer Sphäroplasten-Transfektion in einen sensitiven Hefestamm einzubringen, so dass dieser einen stabilen Killerphänotyp ausbildet. Auf diese Weise wurden die Mykoviren des K1-Killers K7 in den sensitiven *S. cerevisiae*-Stamm GG100-14D eingebracht, wodurch die K1-Killerhefe KIM01 generiert wurde (El-Sherbeini & Bostian, 1987).

3.4.1. Phänotypische Charakterisierung von KIM01 und KIM01s

Zur Charakterisierung dieses Stammes sowie seines Derivates KIM01s wurde die dsRNA beider Hefen isoliert und mittels Gelelektrophorese visualisiert. Weiterhin wurden dsRNA-Präparate des K1-Superkillerstammes T158c, des K2-Killers RV193, des K28-Toxinproduzenten MS300c sowie der Zygotin-sezernierenden Hefe *Z. bailii* 412 angefertigt; als Kontrolle dienten hierbei die *S. cerevisiae*-Wildtypstämme BY4741 und BY4742 (Abb. 40).

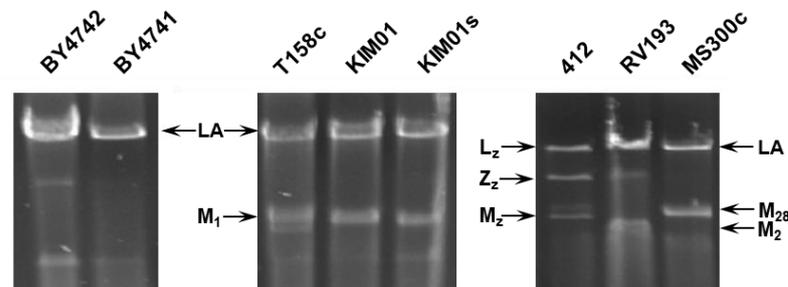


Abbildung 40: Visualisierung extrahierter dsRNA-Genome unterschiedlicher Killerhefen. Doppelsträngige RNA wurde unter Verwendung des Tri-Reagenz aus den angegebenen Hefestämmen isoliert und mittels Gelelektrophorese (1 % Agarose) aufgetrennt. LA-Viren (obere Bande, ca. 4,6 kb) konnten in allen untersuchten Stämmen detektiert werden, wohingegen M₁-Viren (untere Bande, ca. 1,6 kb) lediglich in den K1-Killerstämmen KIM01, KIM01s und T158c auftraten. Eine ungefähre Größenordnung wurde durch Verwendung eines DNA-spezifischen Markers ermöglicht. Als Kontrollen dienten die *S. cerevisiae*-Wildtypstämme BY4741, BY4742. Dargestellt sind zudem die dsRNA-Präparationen der *S. cerevisiae*-Killerstämme RV193 (K2-Killer) und MS300c (K28-Killer) sowie des *Zygosaccharomyces bailii*-Killerstammes 412 (Zygotin-Killer).

Die Präsenz von M₁-Viren in den Killerstämmen KIM01 und KIM01s konnte analog zum K1-Superkiller T158c verifiziert werden. In der Zygotin-produzierenden Hefe *Z. bailii* 412 konnten die drei charakteristischen viralen Genome, LA_z, M_z, und Z_z, nachgewiesen werden, die essentiell zur Ausbildung eines Killerphänotyps in dieser Hefe sind. Analog zu

den analysierten K1-Killerhefen konnten auch im K2- und in den K28-Killerstämmen neben den essentiellen LA-Viren spezifische Killerviren nachgewiesen werden. Das M_2 -Genom hat hierbei die geringste Größe von ungefähr 1,4 kb, während die virale M_{28} -dsRNA mit einer Größe von ca. 1,8 kb detektiert wurde. In den beiden Wildtyphefen BY4741 und BY4742 konnte lediglich das LA-Virus mit einer ungefähren Größe von ca. 4,6 kb nachgewiesen werden (**Abb. 40**).

Zusätzlich zur Isolation der dsRNA wurde eine Sequenzierung des viralen M-Genoms der K1-Killerstämme T158c, KIM01 und KIM01s angestrebt. Hierzu wurde isolierte dsRNA unter zu Hilfenahme des *One-Step-RT PCR*-Kits (NEB) zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und im Anschluss über spezifische Primer amplifiziert. Es wurden sowohl Primer verwendet, die spezifisch an distinkte 5'- und 3'-Regionen des M_1 -Virus binden (M1-Primer), als auch Primer, welche 5' an den N-Terminus der Prä-Region und 3' an den C-Terminus der β -Untereinheit binden (K1-Primer). Nach erfolgter PCR-Reaktion erfolgte die Visualisierung der Banden durch Ethidiumbromid-Färbung (**Abb. 41**).

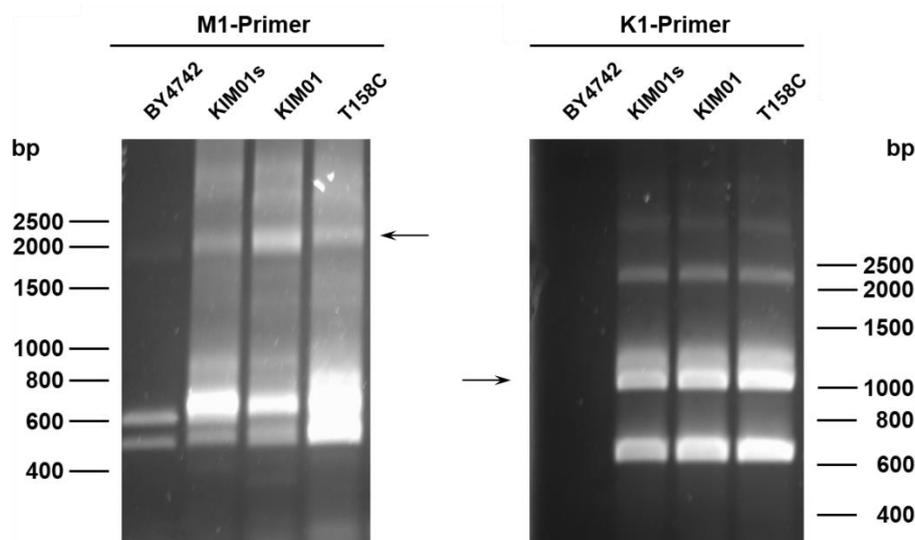


Abbildung 41: Visualisierung der amplifizierten Produkte nach RT-PCR der viralen dsRNA. Zur reversen Transkription des viralen M_1 -Genoms wurde die isolierte dsRNA der Killerhefen T158c, KIM01 und KIM01s als Template für das *One-Step RT PCR*-Kit (NEB) eingesetzt. Es wurden sowohl M1-Primer (links) als auch spezifische K1-Primer (rechts) verwendet. Nach erfolgter PCR und gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Banden mit Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert. Zur ungefähren Größenbestimmung wurde ein DNA-spezifischer Marker (*Hyperladder 1 kb*, Bioline) verwendet. Als Kontrolle wurde isolierte dsRNA des Wildtyps BY4742 eingesetzt. Die Laufhöhe der zu erwartenden PCR-Produkte ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Amplifikation und Sequenzierung viraler dsRNA wird durch die starke Ausprägung von Sekundärstrukturen deutlich erschwert (Szekely & Loviny, 1975). Unter Verwendung von M₁-spezifischen Primern konnten zwar PCR-Produkte auf einer erwarteten Höhe von ca. 2.000 bp amplifiziert werden, allerdings wurde eine Vielzahl von Nebenprodukten detektiert. Im Gegensatz hierzu konnte durch die Verwendung von K1-spezifischen Primern nicht nur die Anzahl der unspezifischen Produkte signifikant reduziert werden, sondern es wurden auch wesentlich distinktere Banden auf der erwarteten Laufhöhe von 1.000 bp beobachtet (**Abb. 41**). Unabhängig von den entstandenen Nebenprodukten wurden die potentiell Toxin-spezifischen Banden aus dem Agarosegel reisoliert und zur Sequenzierung zur Firma *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Deutschland) eingeschickt. Allerdings war wahrscheinlich aufgrund zu starker Verunreinigung bzw. Überlappung mehrerer unterschiedlicher Sequenzen eine eindeutige Bestimmung der Basenabfolge nicht möglich. Unabhängig davon wurde eine weitere Charakterisierung der Stämme KIM01 und KIM01s mit Hinblick auf die biologische Aktivität des potentiell sezernierten Toxins mit Hilfe von MBA-Tests unter Verwendung von intakten und sphäroplastierte Zellen des sensitiven Hefestammes BY4742 angestrebt. Zusätzlich wurde eine quantitative Bestimmung der Menge sezernierter K1-Heterodimere mittels Western Analyse unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers angestrebt (**Abb. 42**).

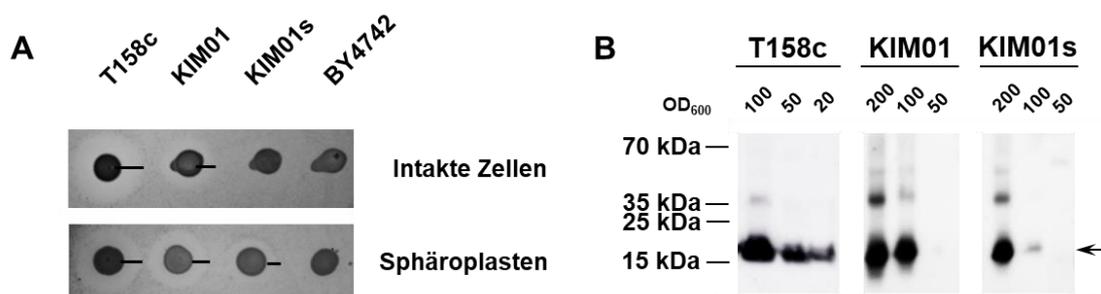


Abbildung 42: A Charakterisierung der biologischen Aktivität der Killertoxine aus KIM01 und KIM01s. Die Toxinaktivität wurde qualitativ mittels MBA-Tests gegen den sensitiven Stamm BY4742 analysiert. Hierzu wurden 10^6 intakte Zellen (oben) bzw. 10^7 sphäroplastierte Zellen (unten) in entsprechenden MBA (Glucose, pH 4,7) eingebettet. 10 μ l einer Übernachtskultur (JG-Medium, 30 °C) der Hefestämme T158c, KIM01 und KIM01s bzw. BY4742 wurden aufgetropft; die Bildung potentieller Hemmhöfe wurde nach einer Inkubation für 3 d bei 20 °C dokumentiert ($n = 10$). **B Quantifizierung der Toxinsekretion.** Die Sekretion von K1-Heterodimern wurde mittels Western Blot unter nicht-reduzierenden Bedingungen und Verwendung eines polyklonalen Antikörpers (α -K1, 1:1.000) analysiert. Hierzu wurde das Kulturvolumen, welches der angegebenen OD₆₀₀ entspricht, abzentrifugiert und die Proteine wurden durch TCA-Zugabe präzipitiert. Banden des K1-Heterodimers wurden auf einer Laufhöhe von ca. 18 kDa detektiert und sind durch einen schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bildausschnitte ($n = 4$), (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Die Auswertung der durch die applizierten K1-Killerhefen induzierten Hemmhöfe zeigte eine deutlich geringe Toxizität des Stammes KIM01s im Vergleich zu KIM01; so konnte die Ausbildung distinkter Hemmzonen lediglich nach Sphäroplastierung der sensitiven Zellen detektiert werden. Im Gegensatz hierzu waren nach Applikation der beiden Killerstämme T158c und KIM01 deutliche Hemmhöfe sichtbar (**Abb. 42**). Die Quantifizierung der durchgeführten Western Analysen bestätigte eine ca. 40 % geringere Sekretion an K1-Toxin für den Killerstamm KIM01s im Vergleich zu KIM01, was mit den Beobachtungen der MBA-Tests korreliert. Der als Kontrolle eingesetzte Killerstamm T158c zeigte nicht nur die deutlichste toxische Wirkung, sondern sezernierte auch eine höchste Menge K1-Toxin.

Neben der Toxizität wurde zudem die Ausbildung der funktionellen Immunität untersucht, die in natürlichen Killerstämmen durch das M₁-Virus vermittelt wird. Hierzu wurden je 10⁶ Zellen der zu untersuchenden Killerstämme in entsprechenden MBA eingebettet und es wurden 1.000 AU K1-Toxin extrazellulär appliziert, als Kontrolle diente der sensitive Stamm BY4742 (**Abb. 43A**).

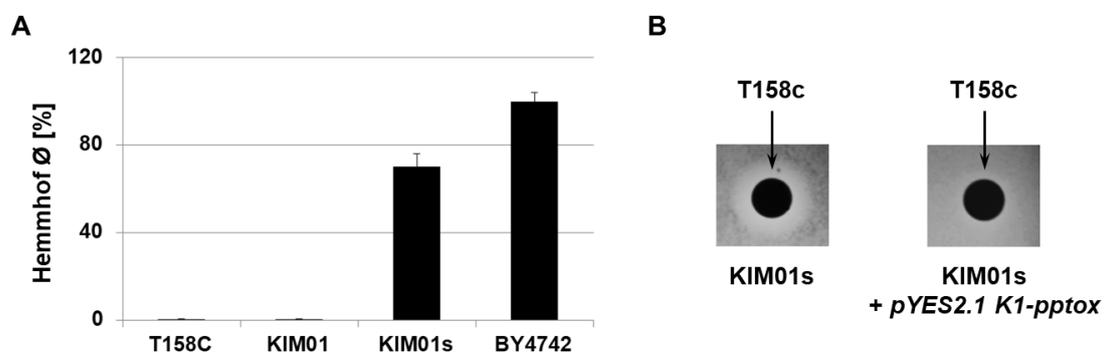


Abbildung 43: A Ausbildung einer funktionellen K1-Immunität in KIM01 und KIM01s. Die Ausbildung der funktionellen Immunität wurde mittels MBA-Diffusionstest analysiert. Hierzu wurden 10⁶ Zellen der jeweiligen Hefestämme (T158c, KIM01, KIM01s und BY4742) in den MBA (pH 4,7, Glucose) eingebettet. Im Anschluss wurden 1.000 AU eines K1-Toxinkonzentrates appliziert, die Ausbildung potentieller Hemmhöfe wurde nach einer Inkubation für 3 d bei 20 °C dokumentiert. Der Hemmhofdurchmesser wurde auf den sensitiven Stamm BY4742 [% ± Stabw] normalisiert (n = 5). **B Komplementation des sensitiven Phänotyps von KIM01s.** Zellen des K1-sensitiven Stammes KIM01s wurden mit K1-pptox (pYES2.1) transformiert, welches für das wildtypische K1-Toxin codiert. 10⁶ Zellen der Transformanten wurden in MBA (Ura d/o, Galactose, pH 4,7) eingebettet und 10 µl einer Übernachtskultur des Killerstammes T158c (10⁷ Zellen) wurden aufgetropft. Die Ausbildung potentieller Hemmzonen um den Killerstamm wurde nach einer Inkubation von 3 d bei 20 °C dokumentiert (n = 3), (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Obwohl in vorangegangenen Experimenten der Killercharakter des Hefestammes KIM01s nicht nur auf RNA-Basis, sondern auch auf Proteinebene verifiziert werden konnte, zeigte

der Stamm überraschenderweise eine atypische, distinkte Sensitivität gegenüber extrazellulär appliziertem K1-Toxin. Die ausgebildeten Hemmhöfe besaßen hierbei einen ca. 25 % geringeren Durchmesser als die wildtypische Hefe BY4742; im Gegensatz hierzu waren die Killerstämme T158c und KIM01 vollständig immun (**Abb. 43A**). Durch Transformation des Stammes mit dem wildtypischen K1-Precursor sollte daher untersucht werden, ob eine Komplementation des Immunitätsverlusts erreicht werden kann bzw. ob in dem Stamm generelle Defekte in der Toxinsekretion oder der Präprotoxin-Prozessierung nachgewiesen werden können (**Abb. 43B**). Hierbei stellte die intrazelluläre Plasmid-getriebene Expression des Vorläufertoxins die Immunität vollständig wieder her, so dass kein Hemmhof nach Applikation des Superkillerstammes T158c beobachtet werden konnte und damit wahrscheinlich keine grundlegenden Defekte der Toxinreifung im sekretorischen Weg bestehen.

Im Hinblick auf diese distinkte atypische K1-Sensitivität eines Killerstammes, der selbst das Toxin produziert, und möglichen Adaptationen auf Membranebene wurden potentielle Unterschiede in der zellulären Lipidkomposition durch eine vergleichende Analyse des Lipidoms von KIM01 und KIM01s durchgeführt (Lipotype GmbH, Dresden). Hierzu wurden die Stämme in JG-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 20 °C inkubiert und anschließend nach Herstellerangaben aufgeschlossen, zur statistischen Analyse wurden Triplikate hergestellt. Wie dem berechneten Plot der *Principle Component Analysis* (PCA) entnommen werden kann, clusterten die Replikate der beiden Stämme untereinander näher beieinander (**Abb. 44A**).

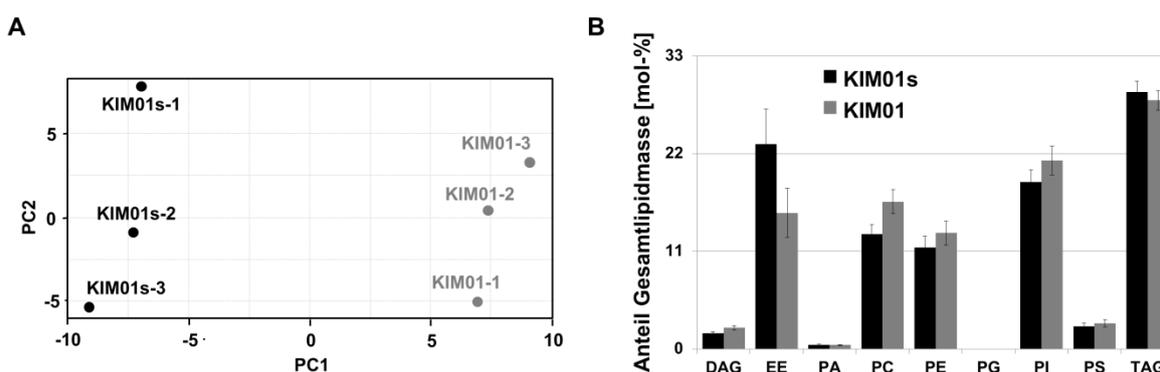


Abbildung 44: Lipidomanalyse der Killerstämme KIM01 und KIM01s. A PCA-Plot der Replikate beider Stämme. Als Inputdaten dienen die Werte aller Lipidspezies [mol-%]. **B Vergleich der Gesamtlipidkomposition.** Dargestellt ist der Prozentanteil der angezeigten Lipidklassen [mol-% \pm Stabw] im Verhältnis zur Gesamtlipidmenge als Mittelwert der Triplikate. DAG: Diacylglycerol, EE: Ergosterolester, PA: Phosphatidsäure, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol, PI: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, TAG: Triacylglycerol (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Trotz des deutlich unterschiedlichen Clusterings der Triplikate im PCA-Plot konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der analysierten Lipidklassen in Bezug auf den Gesamtlipidanteil festgestellt werden (**Abb. 44B**). Bei Betrachtung der einzelnen Lipidspezies in Abhängigkeit ihres Sättigungsgrades zeigten sich hingegen hoch signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen KIM01s und KIM01 (**Abb. 45**).

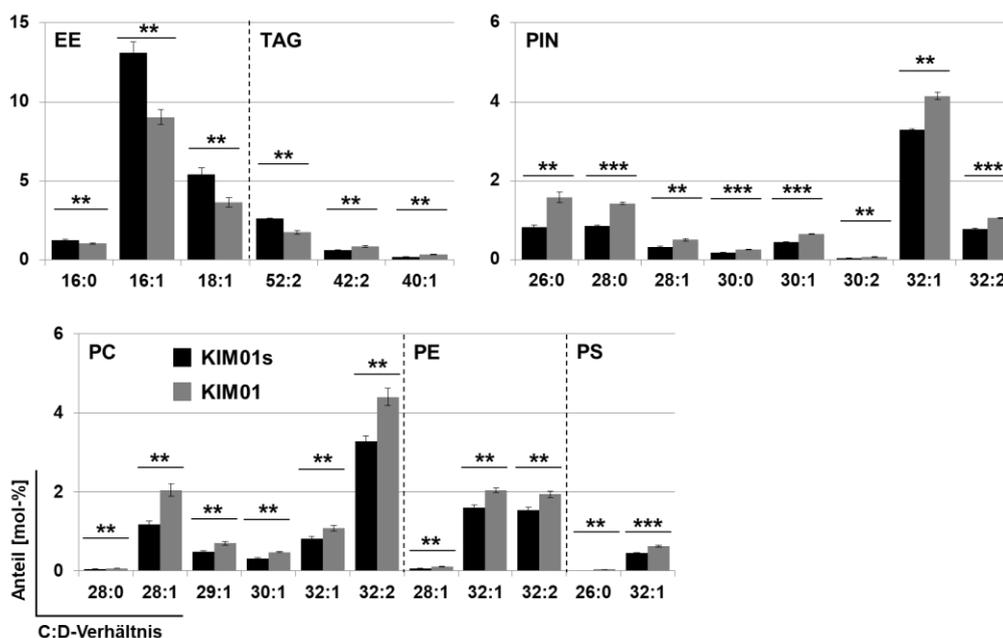


Abbildung 45: Vergleich der einzelnen Lipidspezies der Killerstämme KIM01 und KIM01s. Dargestellt sind die signifikant unterschiedlichen Mittelwerte der Triplikate (\pm Stabw) für jede Lipidspezies [mol-%], (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$). EE: Ergosterolester, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PIN: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, TAG: Triacylglycerol. C:D-Verhältnis: Verhältnis von Kohlenstoff zu Doppelbindungsanzahl. Zur erleichterten Visualisierung der Daten wurden lediglich Lipidspezies mit den signifikantesten Unterschieden illustriert (Vollständige Auflistung der erhaltenen Daten s. Anhang **Tabelle 13**), (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Bei Betrachtung der einzelnen Lipidspezies und unter Berücksichtigung des Sättigungsgrades (Verhältnis von C-Atomen zu Doppelbindungen, C:D-Verhältnis) wurde deutlich, dass Zellen des Stammes KIM01s signifikant höhere Mengen an Ergosterolestern (EE) (EE 16:0, EE 16:1, EE 18:1) in den Membranen aufwiesen (**Abb. 45**). In Membranen des Stammes KIM01 hingegen wurden größere Mengen an unterschiedlichen Lipidspezies der Phospholipide Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PIN) und Phosphatidylserin (PS) nachgewiesen. Hierbei lagen die signifikantesten Unterschiede in der Menge an Phosphatidylserin (PS 26:0, PS 32:1) und diversen Phosphatidylinositol-Spezies (PIN 28:0, PIN 30:0, PIN 30:1, PIN 32:2). Zudem wurde eine höhere Menge der Triacylglycerole TAG 42:2 bzw. TAG 40:1 in den

Membranen von KIM01 gemessen, lediglich TAG 52:2 wies signifikant höhere Konzentrationen in Zellen des Stammes KIM01s auf (**Abb. 45**).

Neben der komparativen Lipidomanalyse, die Unterschiede in der Membranzusammensetzung der beiden Stämme aufzeigen sollte, wurde im Folgenden die Bildung von K1-induzierten Poren in den Killerhefen selbst untersucht. Während die Porenbildung in der Plasmamembran von sensitiven Hefen durch das K1-Killertoxin bereits hinreichend visualisiert werden konnte, ist bis dato nicht geklärt, ob Killerhefen vor diesem Effekt vollständig geschützt sind. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Killerstämme KIM01, KIM01s und T158c in JG-Medium über 48 h bei 20 °C (110 rpm) kultiviert und eine potentielle Porenbildung wurde mittels Propidiumiodid-Färbung und anschließender FACS-Analyse untersucht (**Abb. 46A**).

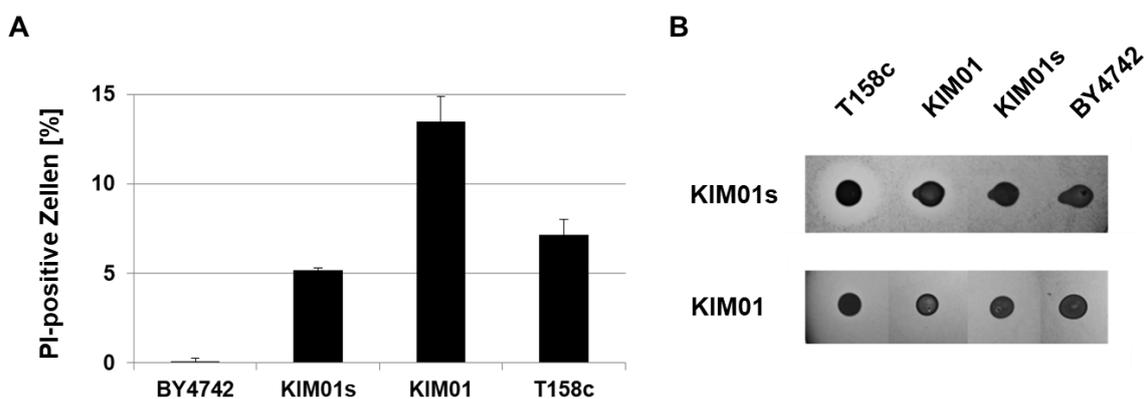


Abbildung 46: A Untersuchung der Porenbildung in K1-Killerstämmen. Die Ausbildung von PI-detektierbaren Poren in den Killerstämmen T158c, KIM01 und KIM01s wurde mittels FACS-Analyse unter Verwendung des Membran-impermeablen Fluoreszenzfarbstoffes PI untersucht. Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes BY4742 dienen als Negativkontrolle. Die Hefestämme wurden in JG-Medium (pH 4,7) bei 20 °C (110 rpm) 2 d kultiviert, Zellen wurden zweimal mit McIlvaine-Puffer (10 mM, pH 4,7) gewaschen und mit 1 µg/ml PI-Lösung versetzt. Dargestellt ist der mittlere Prozentsatz PI-positiver Zellen [% ± Stabw] in jeder Probe (n = 3); das entsprechende *Gate* wurde für jeden Hefestamm durch Verwendung von ungefärbten und Hitze-behandelten Zellen kalibriert und es wurden je 100.000 *Events* für jede Probe gemessen. **B Immunität und Sensitivität von KIM01 und KIM01s.** Die Sensitivität beider Stämme gegen sezernierte K1-Toxine des jeweils anderen Stammes wurde mit Hilfe von MBA-Tests analysiert. Hierzu wurden jeweils 10⁶ Zellen der Stämme KIM01s (oben) und KIM01 (unten) in MBA (Vollmedium, Glucose, pH 4,7) eingebettet und je 10⁶ Zellen einer Übernachtskultur der angegebenen K1-Killer (T158c, KIM01 und KIM01s) wurden aufgetropft. Als Kontrolle diente die gleiche Zellmenge des Wildtyps BY4742. Die Bildung potentieller Hemmhöfe wurde nach Inkubation (3 d, 20 °C) dokumentiert. Zur vereinfachten Visualisierung ist ein Zusammenschritt von repräsentativen Ergebnissen dargestellt (n = 8), (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Die FACS-Analyse ergab sowohl für den Superkiller T158c (8 %) als auch für die K1-Killerstämme KIM01 (13 %) und KIM01s (5 %) eine deutliche Anzahl PI-positiver Zellen. Im Unterschied hierzu konnten für Hefen des Nicht-Killerstammes BY4742 keine PI-

positiven Zellen detektiert werden, was darauf hindeuten könnte, dass Killerzellen *per se* nicht vollständig vor der ionophoren Wirkung ihres eigenen Toxins geschützt sind (**Abb. 46A**).

Zusätzlich wurde mit Hilfe eines MBA-Tests analysiert, inwiefern Zellen beider Killerstämme immun bzw. sensitiv gegen das K1-Toxin des jeweils anderen Stammes reagieren (**Abb. 46B**). Die Ergebnisse zeigten erneut die distinkte Sensitivität von KIM01s gegenüber K1-Toxin der Hefe T158c. Zudem wurde auch nach Applikation von Killerhefen des Stammes KIM01 die Ausbildung eines Hemmhofs beobachtet, der im Vergleich zum Superkillerstamm allerdings deutlich geringer ausfiel. Im Gegensatz hierzu wurde das Wachstum des Killerstammes KIM01 weder durch sezerniertes Toxin von T158c noch von KIM01s inhibiert.

Insgesamt zeigte die phänotypische Charakterisierung der beiden Killerstämme KIM01 und KIM01s signifikante Differenzen zwischen beiden Stämmen auf. Neben der atypischen Sensitivität von KIM01s-Zellen gegenüber additivem K1-Toxin konnte weiterhin eine deutliche Reduktion der Toxinsekretion gezeigt werden, die sich auch in MBA-Tests widerspiegelt. Weiterhin konnten distinkte Unterschiede in den Lipidomen der Killerstämme detektiert werden, die auf potentielle Adaptationen im Hinblick auf die sezernierte Toxinmenge hindeuten. Zusätzlich wurde mit Hilfe einer FACS-Analyse erstmals gezeigt, dass K1-Killerhefen nicht vollständig vor der ionophoren Wirkung ihres eigenen Toxins geschützt sind.

3.4.2. Vergleichende Transkriptomanalyse von KIM01 und KIM01s

Neben rein phänotypischen Untersuchungen der Killerhefen KIM01 und KIM01s sollten potentielle Unterschiede auch hinsichtlich der Genregulation nach Applikation von zusätzlichem K1 mit Hilfe der Illumina Sequenzierung analysiert werden. In Analogie zur RNA-Seq des sensitiven Stammes BY4742 wurde die RNA von KIM01 und KIM01s-Zellen 5 bzw. 45 min nach Zugabe des Killertoxins isoliert, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. In einem ersten Ansatz wurden die erhaltenen Daten jeweils auf diese Kontrolle normiert, so dass sich eine Zeitabhängigkeit der Genexpression untersuchen lies. Im Fall von KIM01 konnte nach 5 bzw. 45 min für ein bzw. drei ORF eine signifikante positive Regulation ($p_{adj.} < 0,05$) berechnet werden. Mit 49 (5 min) bzw. 43 ORF (45 min) wurden allerdings wesentlich mehr hochregulierte DEG im K1-sensitiven Stamm KIM01s detektiert. Im Fall der negativ regulierten Gene wurden sieben (5 min) bzw. 15 ORF (45 min) für KIM01 und sechs (5 min) bzw. 19 ORF (45 min) für den Stamm KIM01s signifikant de-reguliert (komplette Liste der DEG siehe Anhang **Tabelle 14**). Da viele ORF sowohl in KIM01 als auch in KIM01s signifikant differentiell exprimiert wurden, wurde die Anzahl dieser Gene mit Hilfe eines Venn-Diagramms graphisch dargestellt; insgesamt wurden 18 und vier DEG (5 min) bzw. 26 und elf DEG (45 min) in beiden Killerstämmen hoch- bzw. herunterreguliert (**Abb. 47**).

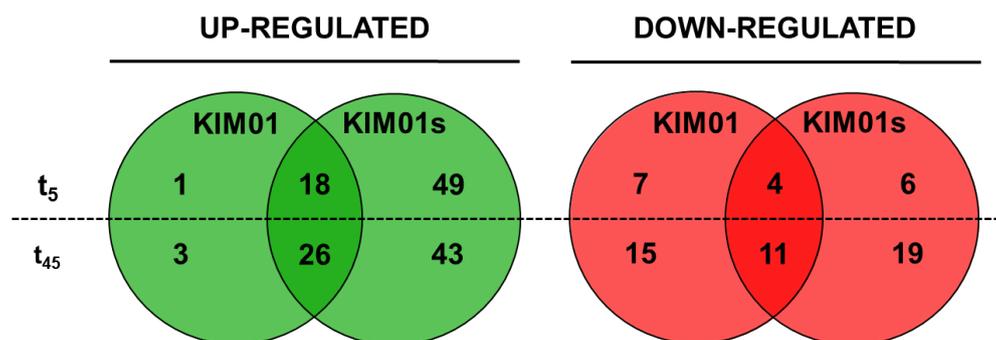


Abbildung 47: Zeitabhängige Transkriptomänderungen in den Stämmen KIM01 und KIM01s nach extrazellulärer K1-Applikation. Signifikant de-regulierte DEG ($p_{adj.} < 0,05$) in den Hefestämmen KIM01 und KIM01s nach 5 min (t_5) bzw. 45 min (t_{45}) Inkubation mit K1-Toxin wurden in Bezug auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle bestimmt. Im Venn-Diagramm dargestellt ist die Anzahl der DEG für hochregulierte (grün, links) bzw. herunterregulierte (rot, rechts) ORF; die überlappenden Regionen zeigen die Anzahl der DEG, die in beiden Stämmen zum angegebenen Zeitpunkt de-reguliert wurden (vollständige Liste s. Anhang **Tabelle 14**).

Bei Betrachtung der positiv regulierten ORF beider ausgewählter Zeitpunkte wird deutlich, dass wesentlich weniger Gene allein im Killerstamm KIM01 signifikant differentiell exprimiert wurden. Lediglich der ORF *STE3*, welcher für den Rezeptor des α -Faktor-Pheromons codiert, war nach 5 min hochreguliert, wohingegen nach einer K1-Inkubation für 45 min zwei der drei Gene, welche für die mitochondriale Glycinderboxylase codieren, sowie ein retrotransposables Gen (YPL060C-A) positiv reguliert vorlagen. Im Gegensatz zu KIM01 wurden deutlich mehr ORF ausschließlich in der Killerhefe KIM01s hochreguliert. Neben Genen, deren Produkte essentiell für den Trehalose- und Glucosemetabolismus sind (*TPS1*, *TPS2* etc.), wurden u. a. auch für die ORF *STE3*, *FUS2*, *FUS1*, *FIG1*, die im GO-Term *Cytogamy* zusammengefasst werden können, sowie *PGM2*, *FET3*, *HMX1*, *FTR1*, *GLK1*, *ENB1*, *SIT1* (*Ion Homeostasis*), signifikant positiv reguliert; zu den hochregulierten DEG konnten auch die ORF der Methioninpermease *MUP1* und *MUP3* gezählt werden. Eine positive Regulation konnte zudem für Gene diverser Stressproteine wie beispielsweise *CTT1*, *XBP1*, *HSP104*, und *TMCI* nachgewiesen werden. Ebenso wurde für die Gene der Transkriptionsfaktoren *TEC1* und *CIN5* ein signifikant positiver *Fold Change* berechnet. Von den insgesamt 18 DEG, die für beide Stämme nach einer kurzen Inkubation (5 min) mit dem K1-Toxin hochreguliert vorlagen, konnte die Mehrheit den biologischen Prozessen *Glucose Transmembrane Transport* (*HXT3*, *HXT4*, *HXT7*, *MTH1*, *HXT2*) und *de novo IMP Synthesis* (*ADE2*, *ADE1*, *ADE17*, *ADE13*, *MTD1*, *SHM2*) zugeordnet werden. Außerdem wurde für die ORF *MSN4* und *HAP4*, die für Transkriptionsfaktoren codieren, in beiden Stämmen ein positiver *Fold Change* berechnet.

Im Vergleich zu den hochregulierten Genen wurden für den Stamm KIM01s deutlich weniger DEG als signifikant negativ-reguliert berechnet (**Abb. 47**). Von diesen sechs ORF codieren lediglich zwei für Proteine, *RPL41B* für ein ribosomales Protein der 60S Untereinheit und *YDL133C-A* für ein Retrotransposon. Im Fall des zweiten analysierten Killerstamms KIM01 konnten die Gene *ALD6*, *GPP1*, *RPL26*, *STL1* als signifikant herunterreguliert berechnet werden, welche für eine cytosolische Aldehyd-Dehydrogenase, die Glycerol-1-Phosphatase, die ribosomale 60S Untereinheit sowie den Glycerol-Proton-Symporter der Plasmamembran codieren. In beiden Killerhefen wurde nach einer fünfminütigen Inkubation mit K1 ein negativer *Fold Change* für die ORF für *CIT1*, *GPD1*, *HXT1* und *SPO24* berechnet. Im Unterschied zu diesen relativ geringen Änderungen des Transkriptoms waren 45 min nach Toxinapplikation 15 DEG in Zellen von KIM01 signifikant herunterreguliert. Diese konnten zum größten Teil in den übergeordneten GO-Term für *Small Molecule Biosynthetic Processes* (*ARG1*, *ENO2*, *HOR2*, *PDC1*, *IMD3*,

RIB4, *ADH1*, *LYS20*) geclustert werden. Für den K1-sensitiven Stamm KIM01s hingegen wurden nach 45 min Inkubation mit dem Killertoxin für 19 DEG - u. a. *HXT3*, *CPA2*, *IMD4* und *HIS5* - eine signifikante negative De-Regulierung berechnet. Auch für die negativ regulierten DEG konnten Überschneidungen beobachtet werden, so dass das Expressionslevel nach Inkubation mit K1-Toxin bei vier ORF in beiden Stämmen herunterreguliert vorlag (t_5); hierzu zählen die Gene *CIT1*, und *SPO24*, deren Produkte unterschiedliche zelluläre Funktionen ausüben. Von diesen vier DEG blieb sowohl für *GPD1* als auch *HXT1* auch nach längerer Inkubationszeit (t_{45}) eine negative Regulation des Expressionslevels bestehen. Zusätzlich waren u. a. auch die ORF *GPP1*, *IMD2* und *LYS1* signifikant herunterreguliert (**Abb. 47**). Insgesamt wurden viele Gene in beiden Stämmen hoch- bzw. herunterreguliert, allerdings zeigte der K1-sensitive Stamm KIM01s eine wesentlich deutlichere transkriptionelle De-Regulation nach Applikation des K1-Toxins. Interessanterweise wurde zudem die differentielle Regulation vieler ORF beobachtet, die in der analog durchgeführten Untersuchung des sensitiven Stammes BY4742 ebenfalls signifikant de-reguliert wurden, so dass die Reaktion auf das Killertoxin möglicherweise Stamm-übergreifende metabolische Adaptationen hervorruft.

Zusätzlich zu der durchgeführten zeitabhängigen Interpretation der Transkriptomanalyse konnten die DEG-Datensätze zu einem paarweisen Vergleich beider Stämme herangezogen werden. Mit Hilfe einer solchen Analyse wurden ORF bestimmt, die zu den gewählten Zeitpunkten (Kontrolle, t_5 und t_{45}) im Killerstamm KIM01 im Vergleich zu KIM01s signifikant hoch- bzw. herunterreguliert vorlagen (komplette Liste aller DEG s. Anhang **Tabelle 16**). Ein Vergleich der basalen Transkriptomzustände beider Hefestämme vor der eigentlichen Applikation von K1-Toxin zeigte bereits drastische Unterschiede, wie mit Hilfe des MA-Plots verdeutlicht wurden (**Abb. 48A**). Eine Quantifizierung der signifikant de-regulierten DEG zeigte, dass 153 ORF in KIM01 bereits ohne Zugabe von K1-Toxin deutlich höher exprimiert wurden, während 134 Gene ein bedeutend geringeres Expressionslevel aufwiesen (**Abb. 48B**), (vollständige Auflistung der DEG s. Anhang **Tabelle 15**).

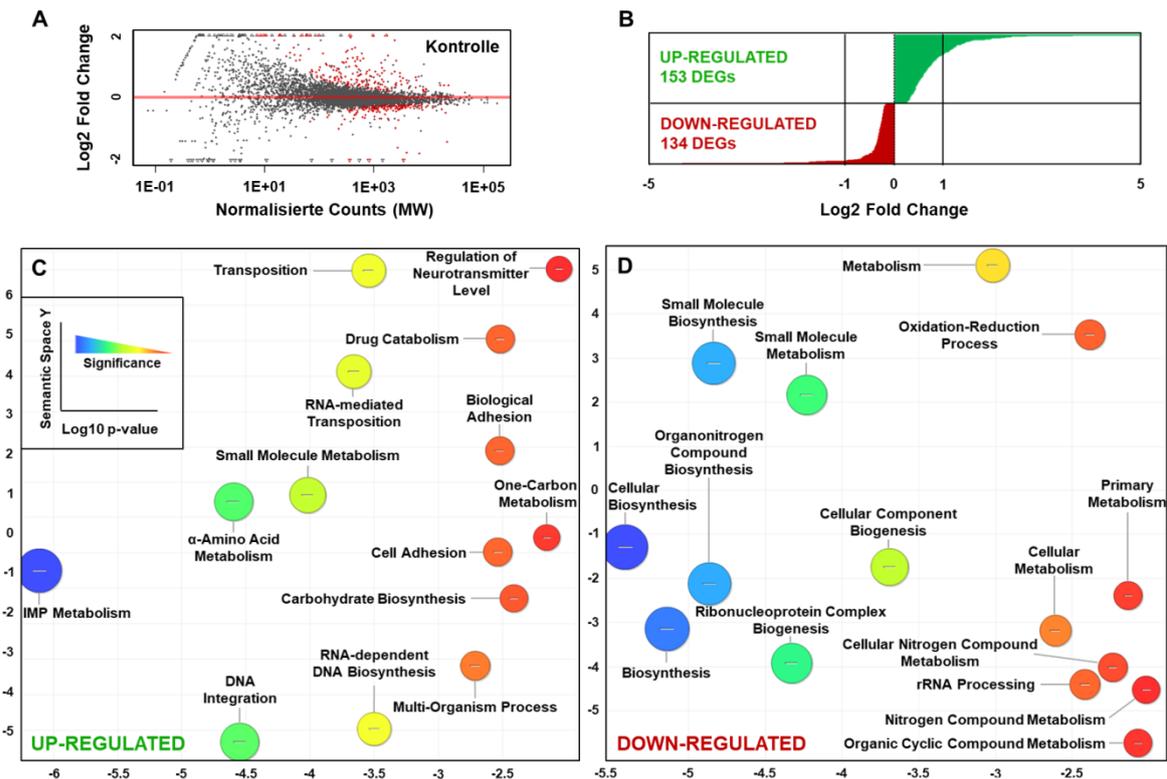


Abbildung 48: Unterschiede im basalen Transkriptom der Stämme KIM01 und KIM01. **A** MA-Plot. Der dargestellte MA-Plot repräsentiert die basalen Unterschiede im Transkriptom der Stämme KIM01 und KIM01s vor K1-Toxinzugabe. Signifikant de-regulierte DEG sind rot markiert. **B** Anzahl der signifikanten DEG. Dargestellt ist die Anzahl der signifikant veränderten DEG in Abhängigkeit des zugehörigen \log_2 -Fold Changes ($Cut\text{-}Off \ |5|$, $p < 0,05$). Im Vergleich zu KIM01s waren im Killerstamm KIM01 153 Gene signifikant hoch- und 134 Gene herunterreguliert. **C**, **D** Visualisierung der signifikant hoch- und herunterregulierten DEG in KIM01. DEG ($p < 0,05$) wurden anhand ihres \log_2 -Fold Changes in hoch- (**C**) und herunterregulierte (**D**) Gene klassifiziert. Im Anschluss wurde mit Hilfe der Software *Gorilla* ein GO-Enrichment für jedes Datenset durchgeführt. Die Visualisierung der signifikant angereicherten GO-Terme erfolgte mittels *Revigo* (FDR-corrected q -value $< 0,01$). X-Achse: \log_{10} p -Wert, Y-Achse: *Semantic Space Y* (Angabe der Ähnlichkeit zwischen einzelnen GO-Termen). Farbe und Größe der abgebildeten Kreise korreliert mit dem entsprechenden \log_{10} p -Wert (blau: höchste Signifikanz), (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Zur Visualisierung der DEG wurde eine GO-Analyse beider Datensets (hoch- und herunterregulierte DEG) angefertigt, welche mit *Revigo* visualisiert wurde. Im Fall der positiv regulierten DEG (**Abb. 48C**, *Up-regulated*) konnte eine signifikante Anreicherung des GO-Terms *IMP Metabolism* gezeigt werden, welcher u. a. die Gene *ADE4*, *ADE2*, *ADE1*, *ADE17*, *ADE5,7*, *ADE13*, *ADE6*, und *ADE12* beschreibt. Zusätzlich waren ORF, die in den GO-Termen *DNA Integration* und *Transposition* zusammengefasst werden können, signifikant höher exprimiert. Bei Genen wie beispielsweise *ARO10*, *GCV1*, *ARG1*, *CHA1* und *SER1* (*Amino Acid Metabolism*) und *SAG1*, *FLO9*, *AGA1*, *FIG2* (*Cell Adhesion Processes*) konnte ebenfalls ein basal höheres Expressionslevel im Stamm KIM01 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten besonders Gene, die in eine generelle Stressantwort der Zelle involviert sind, eine höhere Basalexpression in KIM01 im direkten

Vergleich zu KIM01s; hierzu können beispielsweise Gene des Trehalose-Metabolismus, wie *TPS1*, *TSL1*, und *UGP1* gerechnet werden (*Carbohydrate Biosynthesis*). Eine signifikant niedrigere Expression zeigten mit 62 DEG besonders viele Gene, die im GO-Term *Cellular Biosynthetic Process* zusammengefasst werden können und zu denen beispielsweise die ORF *LYS4*, *URA5*, *NPT1*, *CYT1*, *ERG28*, *ERG2*, *ERG11* und *IMD4* gehören. Eine weitere Gruppe an DEG, die basal im Stamm KIM01 signifikant geringer exprimiert wurden, codieren für diverse Proteine beider ribosomalen Untereinheiten und werden durch den GO-Term *rRNA Processing* repräsentiert (**Abb. 48D**, *Down-regulated*).

Ergänzend zum Vergleich der Transkriptomdaten beider Kontrollen, welche eine Beschreibung der basalen Expressionslevel in den untersuchten Killerstämmen KIM01 und KIM01s zulassen, wurden im Folgenden durch eine paarweise Korrelation potentielle Änderungen der Genexpression beider Hefen nach Toxinzugabe gegenübergestellt. Analog zu den Basaltranskriptomdaten wurden hierbei ebenfalls signifikante Unterschiede detektiert, die mit Hilfe von MA-Plots verdeutlicht wurden (**Abb. 49A**). Insgesamt wurden im Killerstamm KIM01 nach Inkubation mit K1-Killertoxin und im Vergleich zum Stamm KIM01s 20 (t_5) bzw. 24 (t_{45}) Gene signifikant höher und 42 bzw. 18 ORF signifikant niedriger exprimiert. Für jedes dieser Cluster, d. h. hoch- bzw. herunterregulierte Gene, konnte eine Überschneidung von 33 bzw. 23 Genen beobachtet werden, die für beide Zeitpunkte signifikant de-reguliert vorlagen (**Abb. 49B**).

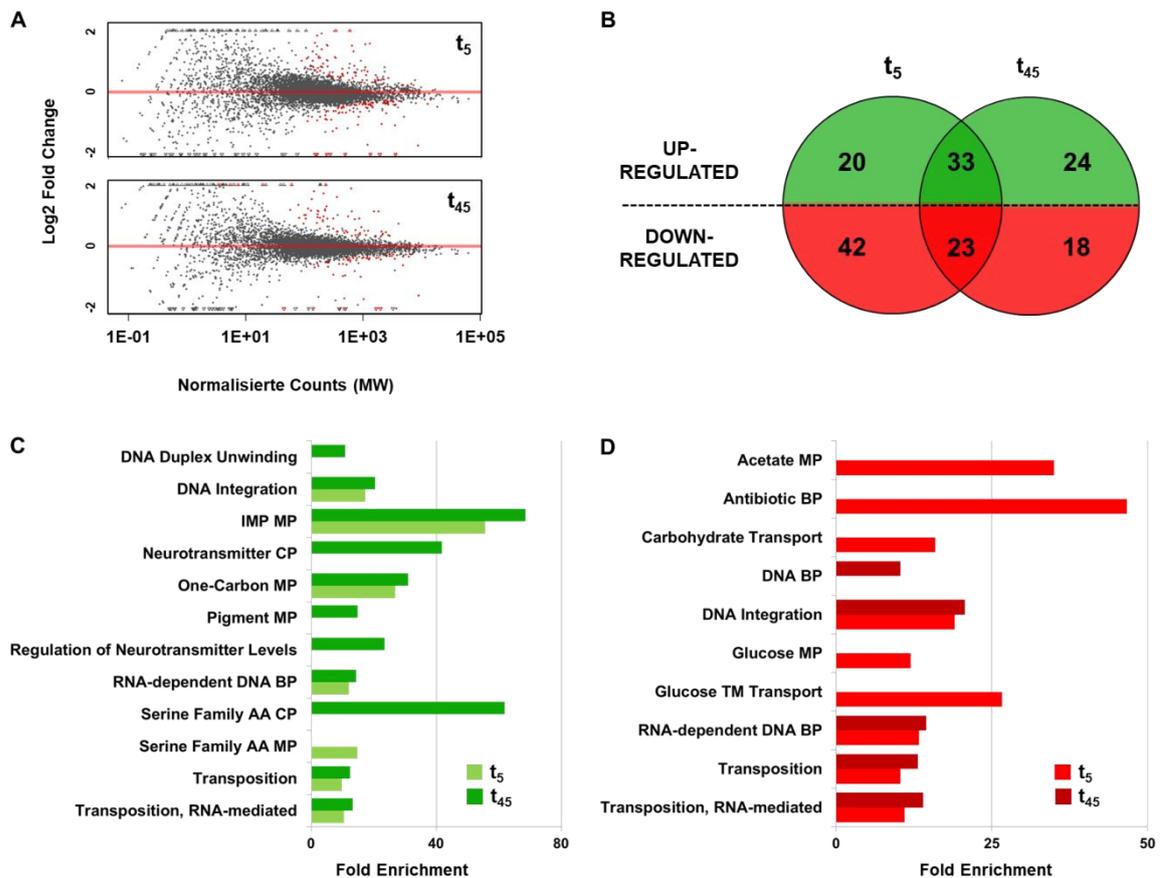


Abbildung 49: Paarweiser Vergleich der Transkriptomdaten der Stämme KIM01 und KIM01s in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit K1-Toxin. **A** MA-Plot. DEG beider Stämme sind als Verhältnis von \log_2 -Fold Change zum Mittelwert der Counts für t_5 (oben) und t_{45} (unten) dargestellt. Gene mit ähnlichem Expressionslevel liegen entlang der horizontalen Nulllinie (rot), signifikant regulierte DEG sind in Rot dargestellt. **B** Venn-Diagramm der signifikant de-regulierten ORF. Signifikante DEG ($p < 0,05$) für die jeweiligen Zeitpunkte t_5 und t_{45} wurden in hoch- (grün) und herunterregulierte (rot) Gene geclustert. Dargestellt ist die Anzahl der Gene für jedes Datenset, die überlappende Region des Diagramms zeigt die ORF an, die zu beiden Zeitpunkten hoch- bzw. herunterreguliert waren. **C, D** Visualisierung des Fold Enrichments der hoch- (C) bzw. herunterregulierten (D) DEG. Signifikante DEG ($p < 0,05$) wurden in hoch- bzw. herunterregulierte ORF klassifiziert. Die Berechnung des GO-Enrichments erfolgte mit Hilfe der Gorilla-Software, das anschließende Clustering und die Visualisierung der signifikant angereicherten GO-Terme (FDR-corrected q -value $< 0,01$) erfolgte mittels Revigo. Zur Vereinfachung wurden lediglich GO-Terme mit einem Fold Enrichment > 10 dargestellt (vollständige Liste s. Anhang **Tabelle 17**). AA: Amino Acid, BP: Biological Process, CP: Catabolic Process, IMP: Inosine Monophosphate; MP: Metabolic Process (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Zur Visualisierung der hoch- und herunterregulierten DEG beider Zeitpunkten wurde eine GO-Analyse (*Biological Process*) durchgeführt, die ein *Fold Enrichment* (F.E.) innerhalb der Datensätze aufzeigen sollte (**Abb. 49C** und **D**). Im Vergleich zu KIM01s konnte für den K1-Killer KIM01 über beide Zeitpunkte eine signifikante Anreicherung der hochregulierten GO-Terme *IMP Metabolism* und *One-Carbon Metabolism* mit einem F. E. von 53,4 bzw. 68,5 (*IMP MP*) sowie 25,7 bzw. 30,9 (*One-carbon MP*) berechnet werden (**Abb. 49C**). GO-Terme, die DNA- und RNA-abhängige Prozesse zusammenfassen, wie *DNA Integration*

(F.E. 18,9 und 20,4), *RNA-dependent DNA BP* (F.E. 13,2 und 14,3) bzw. *Transposition* (F.E. 10,5 und 12,4), wurden ebenfalls für beide Zeitpunkte angereichert. Im Vergleich hierzu zeigten die biologischen Prozesse *DNA Duplex Unwinding* (10,8), *Neurotransmitter CP* (41,7), *Regulation of Neurotransmitter Levels* (23,4) und *Pigment MP* (14,8) lediglich ein deutliches *Fold Enrichment* nach 45 min; der GO-Term *Serine Family Amino Acid CP* wurde ebenfalls mit einem F. E. von 61,8 angereichert. Im Fall der herunterregulierten DEG konnte durch die GO-Analyse eine Anreicherung der Terme *DNA Integration* (19,0 und 20,7), *RNA-dependent DNA BP* (13,3 und 14,5), *Transposition* (10,4 und 13,2) sowie *Transposition RNA-dependent* (11,0 und 14,0) für beide Zeitpunkte (t_5 und t_{45}) berechnet werden (**Abb. 49**). Des Weiteren wurden biologische Prozesse, die Gene des Kohlenhydratmetabolismus‘ umfassen, signifikant nach 5 min Inkubation mit einem *Fold Enrichment* von 21,1 (*Carbohydrate Transmembrane Transport*), 26,7 (*Glucose Transmembrane Transport*) und 12,0 (*Glucose Metabolic Process*) angereichert. Zusätzlich zeigten die GO-Terme *Acetate Metabolic Process* sowie *Antibiotic Biosynthetic Process* ein signifikantes *Enrichment* nach 5 min. Eine Auflistung der GO-Terme und der Gene, die darin zusammengefasst wurden, kann **Tabelle 17** (s. Anhang) entnommen werden.

Zusammenfassend wurden auch im paarweisen Vergleich signifikante Unterschiede zwischen beiden K1-Killerstämmen beobachtet. Bereits die basale Genexpression zeigte in KIM01-Zellen eine deutlich höhere Expression an unterschiedlichen Genen, die für die zelluläre Stressabwehr essentiell sind. Simultan wurde in diesem Stamm ebenfalls eine positive Regulation von Genen des Energie- und IMP-Metabolismus detektiert. Zusammen mit den niedriger exprimierten Genen scheint KIM01 bereits ohne Toxinzugabe deutlich stärker an diverse Umweltstresssituationen angepasst zu sein; ein ähnliches Bild ergab sich auch nach Toxinzugabe. Für einige Stressgene wurde in KIM01 nach Applikation von zusätzlichem K1-Toxin eine weitere Hochregulation beobachtet, die auf eine zusätzliche Erhöhung der zellulären Kapazität zur Abwehr von Zellstress hindeuten.

4. DISKUSSION

Die Ausprägung eines Killerphänotyps ist ein weitverbreitetes Phänomen in vielen verschiedenen Hefestämmen und beruht auf der Sekretion von toxischen niedermolekularen Proteinen bzw. Glycoproteinen, welche den Killerstamm befähigen, andere Hefen ohne direkten Zellkontakt abzutöten. Ein besonderes Merkmal, welches Killerhefen von anderen Toxinproduzenten deutlich differenziert, ist die Notwendigkeit eines intrinsischen Immunitätsmechanismus, der die Toxin-produzierende Zelle vor der Wirkung ihres eigenen Toxins schützt. Anders als beispielsweise bakterielle Toxine, welche gezielt eukaryontische Zielstrukturen angreifen, oder antimikrobielle Peptide, besitzen Killertoxine Hefespezifische Rezeptoren, die an der Zellwand bzw. Plasmamembran von sowohl sensitiven als auch Killerhefen vorkommen. Für die Bäckerhefe *S. cerevisiae* sind bis dato vier unterschiedliche Killertoxine bekannt, die über spezifische im Cytoplasma persistierende dsRNA-Viren codiert werden. Während die toxische Wirkung des Killertoxin Klus bisher nicht genauer identifiziert werden konnte, beruht die Toxizität des K28-Toxins auf einem G1/S-Zellzyklusarrest der Zielzelle; K1 als auch K2 hingegen wirken als ionophore Toxine, die durch Disruption der Plasmamembran zum Absterben von sensitiven Zellen führen (Rodriguez-Cousino *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 1996; Bussey, 1991; Novotná *et al.*, 2004).

Im Fall des K1-Toxins konnte bereits in früheren Studien die ionophore Wirkung festgestellt werden, wobei die Bildung der Poren selbst erstmals an artifiziellen Liposomen genauer charakterisiert wurde. K1 interagiert in einem zweistufigen Rezeptor-vermittelten Prozess zunächst mit der β -1,6-Glucanfraktion der Zellwand und wird anschließend zur Plasmamembran transloziert, an der eine Bindung an den Sekundärrezeptor Kre1p initiiert wird. Anders als K28, welches nach Bindung an seinen Plasmamembranrezeptor Erd2p endocytisiert wird und retrograd den sekretorischen Weg der Zielzelle parasitiert, konnte für das K1-Toxin bislang nicht bewiesen werden, ob die Porenbildung direkt durch das Toxin selbst oder aber durch potentielle primäre Effektoren initiiert wird (Breinig *et al.*, 2002). Allerdings werden nach K1-Intoxikation ein unkontrollierter Einstrom von Protonen in das Cytoplasma, der zu einem Absinken des intrazellulären pH-Wertes führt, sowie ein Kaliumefflux beobachtet. Infolge dessen bricht der Transmembranprotonengradient zusammen und die protonenmotorische Kraft, welche die elektrochemische und energetische Stabilisierung der Zelle sichert, kommt zum Erliegen; letztendlich kumuliert dies im Absterben der sensitiven Zelle (Bussey & Sherman, 1973; de la Pena *et al.*, 1980; 1981). Bis heute konnte allerdings trotz intensiver Forschung lediglich die Vermittlung der

Immunität des K28-Killertoxins auf molekularer Ebene weitestgehend aufgeklärt werden (Breinig *et al.*, 2006).

Optimierung der pH- und Temperaturstabilität des K1-Toxins

Unterschiedliche Killersysteme zeichnen sich durch die Sekretion von Toxinen aus, die sensitive Zellen in einem spezifischen Temperatur- sowie pH-Optimum abtöten. Während Toxine der Hefegattungen *Pichia acaciae* bzw. *Kluyveromyces lactis* in einem neutralen bis leicht basischen pH-Bereich (pH 5,0-7,8) ihre höchste Aktivität zeigen, liegt das Optimum für die Killertoxine der Hefe *S. cerevisiae* im sauren Bereich bei ungefähr 4,0 bis 4,7 (Butler *et al.*, 1991; Magliani *et al.*, 1997). Zusammen mit dem Temperaturoptimum von 20 °C wird so eine Aufreinigung biologisch aktiver Toxinmoleküle deutlich erschwert. Folglich konnte bis dato auch keine ausreichende Menge an aktivem K1-Toxin mit qualitativ hoher Proteinreinheit isoliert werden, die zur Analyse einer Proteinkristallstruktur mittels Röntgendiffraktometrie eingesetzt werden könnte. Eine solche Strukturanalyse könnte nicht nur die Tertiärstruktur des Toxins aufklären, sondern auch elementare Hinweise auf den toxischen Mechanismus geben.

Vorangegangene Untersuchungen an den Killertoxinen K1, K28 und Zygocin, einem Killertoxin der Schadhefe *Zygosaccharomyces bailii*, konnten bereits die distinkte pH-Sensibilität beschreiben, die zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der getesteten Toxine bei einem pH über 6,0 führte. Zusätzlich konnte im Vergleich zu Zygocin eine hohe Temperaturstabilität von K1 und K28 beschrieben werden, die wahrscheinlich auf der heterodimeren Struktur der Killertoxine beruht (Sehn, 2005). Eine Zugabe von Glycerol bzw. Hydroxyectoin führte allerdings zu einer deutlichen Stabilisierung der Killeraktivität, so dass in dieser Arbeit durch Verwendung unterschiedlicher Kultivierungsmedien Toxinkonzentrate mit möglichst hoher Aktivität und einer potentiell geringeren pH- und Temperatursensitivität hergestellt werden sollten. Klassischerweise erfolgt die Produktion von Killertoxinen der Bäckerhefe in synthetischem B-Medium, das bereits durch diverse Modifikationen an die Produktion des Killertoxin K28 angepasst wurde (Heerde & Radler, 1978). Weiterhin wurde das ebenfalls synthetische Minimalmedium YNB-D-Brij58 auf seine Eignung zur Produktion eines K1-Konzentrates getestet. Dieses Medium findet bereits Anwendung in der Anreicherung des ebenfalls ionophoren Killertoxins PMKT der Hefe *Pichia membranifaciens* und könnte im Vergleich zum B-Medium deutliche Vorteile für die K1-Produktion besitzen (Santos & Marquina, 2004). Neben diesen synthetischen Medien

wurde das komplexe JG-Medium zur Toxinherstellung verwendet, das bereits zur Produktion von K1 verwendet wird (Flegelova *et al.*, 2002). Zwar konnte erfolgreich ein biologisch aktives K1-Toxinkonzentrat in allen verwendeten Medien hergestellt werden, allerdings wurden deutliche Unterschiede in der generellen Toxinstabilität festgestellt. Insgesamt führte die Toxinproduktion in YNB-D-Brij58- als auch JG-Medium zu signifikant höheren Toxinmengen bzw. zu einer deutlichen Stabilisierung des Killertoxins bis zu einem pH-Wert von 6,0. Ab einem neutralen pH-Wert von 7,0 hingegen konnte für keines der verwendeten Medien eine Restaktivität des K1-Toxin verzeichnet werden, so dass es sich bei diesem pH wohl um einen Schwellenwert handelt, der zu einer irreversiblen Inaktivierung des K1-Heterodimers führt. Zusätzlich zu der Stabilisierung in neutralen pH-Bereichen führte die Verwendung von JG- und YNB-D-Brij58-Medium auch zu einer deutlichen Verringerung der Temperaturlabilität des ionophoren Toxins. Die stabilisierende Wirkung von Brij58, einem Polyoxyethylen-20-cetylether, konnte bereits für das Killertoxin der Hefe *Pichia kluyveri* gezeigt werden (Middelbeek *et al.*, 1979). Die hohe Stabilisierung des K1-Toxin im JG-Medium beruht wahrscheinlich auf der Kombination des Glycerol- und Peptonanteils sowie des zugesetzten Hefeextraktes (Sehn, 2005).

Neben einer Stabilisierung der toxischen Aktivität stellen auch potentielle Verunreinigungen des Toxinkonzentrates mit weiteren sezernierten Proteinen einen wichtigen Faktor dar, welcher Einfluss auf die Ausbildung bzw. Analyse einer K1-Kristallstruktur hat. Hierbei zeigte vor allem die Verwendung der synthetischen Medien einen deutlichen Vorteil, da nahezu keine weiteren Proteinverunreinigungen beobachtet werden konnten. Durch die Charakterisierung der Toxinkonzentrate in den unterschiedlichen Medien wurde deutlich, dass die Wahl des Kulturmediums an die darauffolgenden Applikationen des K1-Toxins angepasst werden sollte. Während die Verwendung des JG-Mediums zur Herstellung des Killertoxins deutliche Vorteile hinsichtlich der generellen Toxinstabilität aufwies, kann ein solches Konzentrat aufgrund der hohen Verunreinigung nicht zur weiteren Aufreinigung genutzt werden; gleichzeitig eignet es sich allerdings besonders für MBA-Diffusionstests. Basierend auf diesen grundlegenden Beobachtungen wurde ein K1-Toxinkonzentrat in YNB-D-Brij58 hergestellt und zur Aufreinigung mittels Kationenaustauschchromatographie eingesetzt. Die in dieser Arbeit durchgeführten ersten Versuche konnten zeigen, dass sowohl eine Bindung des Toxins erreicht werden konnte als auch eine Elution von biologisch aktivem Toxin möglich war. In zukünftigen Ansätzen könnte durch Verwendung einer azideren mobilen Phase sowie einer Säule mit größerem Bettvolumen eine deutliche Steigerung der Bindekapazität erreicht werden. Zudem wurde in dieser Arbeit lediglich die

Killeraktivität des Eluats untersucht, weshalb eine Untersuchung der tatsächlichen Reinheit der eluierten Fraktionen mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie- bzw. Silberfärbung notwendig wäre. Insgesamt scheint die Verwendung eines Kationenaustauschers allerdings generell zur Aufreinigung des K1-Toxins geeignet zu sein, wobei diese Methode zudem den Vorteil hat, dass keine zusätzliche Kopplung der Säulen beispielsweise mit spezifischen Antikörpern notwendig ist.

Charakterisierung der toxischen Wirkung des K1-Killertoxins

Das Wirkungsspektrum eines Killertoxins wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. So spielt neben der Zusammensetzung der Zellwand und der Plasmamembran auch der zugrundeliegende generelle Wirkungsmechanismus des Toxins eine entscheidende Rolle; generell zeichnen sich ionophore Toxine durch eine sehr schnelle Wirkung aus. So konnte nicht nur für das Killertoxin Zygocin, sondern auch für pflanzliche Defensine, die ebenfalls als Ionophor wirken, eine charakteristische Abtötungskinetik gezeigt werden (Weiler & Schmitt, 2003; Thevissen *et al.*, 1996; Thevissen *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde das Wirkungsspektrum des Killertoxins K1 gegen intakte Zellen unterschiedlicher Hefegattungen analysiert. Hierbei wurde deutlich, dass K1 die stärkste *in vivo* Toxizität gegen Hefen der Gattungen *S. cerevisiae* und *C. glabrata* aufwies. Zudem wurde eine distinkte toxische Wirkung gegen Stämme der Gattung *C. albicans* beobachtet, die allerdings im Vergleich zu Zygocin signifikant geringer ausfiel (Weiler *et al.*, 2003). Weiterhin war das K1-Toxin nicht in der Lage, Hefen der Gattungen *Pichia* abzutöten. Insgesamt lässt dies auf unterschiedliche Mechanismen der beiden ionophoren Killertoxine schließen, was auch durch die beschriebene zeitliche Diskrepanz zwischen Toxinapplikation und Eintritt der toxischen Wirkung unterstützt wird. Für das Killertoxin Zygocin wurde bis dato kein Sekundärrezeptor beschrieben, so dass bislang eine direkte Einlagerung des Monomers in die Plasmamembran der Zielzelle postuliert wird (Weiler & Schmitt, 2003). Da für die toxische Wirkung von K1 eine Interaktion mit dem Sekundärrezeptor Kre1p notwendig ist, könnte das Fehlen dieses Proteins bzw. eines äquivalenten Homologes ein Grund für die ausbleibende toxische Wirkung gegen andere Hefegattungen sein. Gleichzeitig könnte die enge phylogenetische Verwandtschaft von *S. cerevisiae* und *C. glabrata* die hohe Sensitivität verschiedener Stämme dieser Gattungen erklären (Diezmann *et al.*, 2004). Da auch die Menge an β -1,6-Glucan der Zellwand eine wichtige Rolle in der initialen Toxinbindung spielt, könnten unterschiedliche Mengen dieser

Primärrezeptorfraktion zur fehlenden Toxizität beitragen. Aus diesem Grund könnte das Wirkungsspektrum des K1-Toxins erneut gegen sphäroplastierte Zellen unterschiedlicher Hefegattungen analysiert werden; eine deutlich toxische Wirkung gegen Sphäroplasten von *C. albicans* sowie *K. lactis* konnte auf diese Weise bereits gezeigt werden (Zhu & Bussey, 1989).

Neben dem generellen Wirkungsspektrum von K1 wurde eine zeitliche Korrelation der Porenbildung mit der tatsächlichen Abnahme der Lebendzellzahl durchgeführt. Wie bereits ausgeführt, wurde in Analysen hinsichtlich der ionophoren Wirkung des Killertoxins Zygozins festgestellt, dass dieses im Vergleich deutlich schneller zu einer positiven PI-Färbung sensitiver Zellen führt als K1, wobei diese *Lag*-Phase bereits in unterschiedlichen Untersuchungen beobachtet werden konnte (Bussey, 1991). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Zeitverzögerung des Eintritts der ersten Porenbildung mit Hilfe einer quantitativen FACS-Analyse der PI-positiven Zellen reproduziert werden. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäureinterkalator, der intakte Membranen nicht durchdringen kann; diese Membranundurchlässigkeit wurde durch längerfristige Inkubation der Substanz mit Hefezellen, die mit Hitze-inaktiviertem K1-Toxin behandelt wurden, bestätigt. Das erste Auftreten von PI-positiven Zellen konnte 60 Minuten nach Applikation des K1-Toxins beobachtet werden. Hierbei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die Ausbildung kleinerer Poren, die über eine PI-Färbung nicht detektiert werden können, bereits früher eintritt. Dennoch konnte mit Hilfe dieser Analyse deutlich gezeigt werden, dass die Bildung von Poren in der Plasmamembran nicht direkt mit dem Absterben der entsprechenden Zelle korreliert. Weiterhin lässt sich die vergleichsweise lange *Lag*-Phase von ca. 180 Minuten bis zum Eintritt einer exponentiellen Wachstumsphase der Hefezellen, die als Kontrolle mit Hitze-inaktiviertem Toxin inkubiert wurden, durch die gewählten Versuchsbedingungen erklären, die sich vor allem an den Optima der Toxinaktivität orientierten. Basierend auf dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass sensitive Zellen initiale Abwehrmechanismen besitzen, die sie zumindest kurzfristig vor der Wirkung des K1-Toxins schützen können; entsprechende experimentelle Untersuchungen zur Unterstützung dieser Hypothese wurden mit Hilfe einer Transkriptomanalyse des sensitiven Stammes BY4742 durchgeführt (Gier *et al.*, 2019a).

Hypothetisches Modell zur Prozessierung des K1-Precursors

Die viral codierten Killertoxine der Hefe *S. cerevisiae* werden als Vorläufertoxine mit einer distinkten Domänenstruktur translatiert. Einer N-terminalen *Leader*-Sequenz, die aus einem ER-Importsignal sowie einer Pro-Region aufgebaut ist, folgen die beiden Haupttoxinuntereinheiten α und β , welche im Fall von K1 und K28 durch eine γ -Sequenz separiert sind. Obwohl die Killertoxine weder signifikante Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz noch in ihrem Wirkungsmechanismus aufweisen, verläuft die Prozessierung der Killertoxine im sekretorischen Weg der Wirtszelle ähnlich. Dieser Reifungsprozess umfasst diverse post-translationale Modifikationen und Prozessierungsschritte, die essentiell mit dem toxischen Effekt bzw. der Ausbildung einer funktionellen Immunität des jeweiligen Toxins verknüpft sind. Im Unterschied zu K28, dessen Immunitätsmechanismus auf dem post-translationalen Import des Toxinvorläufers in das ER der Zielzelle beruht, wodurch re-internalisierte reife Toxinmoleküle an diesen binden und als Komplex proteasomal degradiert werden, können für die K1-Immunität lediglich Hypothesen aufgestellt werden. Eine klassische Herangehensweise zur Identifizierung molekularer Komponenten, die an der Vermittlung der Immunität oder aber auch am toxischen Effekt beteiligt sein könnten, stellt die Verwendung von Deletionsmutanten dar. Ein Genom-weites Screening konnte hierbei bereits wichtige Hinweise auf diverse zelluläre Prozesse geben, die essentiell für die Funktionsweise des Killertoxins sind (Pagé *et al.*, 2003). Problematisch ist hierbei allerdings, dass viele Deletionsmutanten pleiotrope Effekte induzieren. So führen vor allem Veränderungen der Zellwandkomposition dazu, dass viele Mutanten resistent gegen extrazellulär appliziertes Toxin werden und somit potentielle Auswirkungen *downstream* der Primärrezeptorfraktion nicht analysiert werden können. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche K1-Derivate hergestellt, die intrazellulär exprimiert werden können, so dass auf eine extrazelluläre Toxinapplikation verzichtet werden kann. Hierbei wurde gezeigt, dass die Expression der toxischen α -Untereinheit in sensitiven Zellen zu einem Selbstkillerphänotyp führt; ein ähnlicher Phänotyp wurde bereits für K28- α -Derivate beobachtet (Reiter, 2004). Hierbei konnte zudem festgestellt werden, dass die konstruierten α -Derivate nicht in das ER der Hefe importiert werden müssen, um ihre toxische Wirkung zu entfalten und dass die β -Untereinheit zur Ausbildung der Porenbildung nicht notwendig ist (Gier *et al.*, 2017).

Neben der generellen toxischen Wirkung der α -Untereinheit sollte zudem analysiert werden, ob die Vermittlung der Immunität prinzipiell durch eine Co-Expression des K1-Precursors möglich ist. Im Unterschied zu einer verkürzten Toxinprecursor-Variante, welcher das ER-Importsignal sowie die Pro-region fehlen (K1-tox), konnte gezeigt werden, dass das wildtypische Volllängentoxin die Ausbildung der funktionellen Immunität vollständig gewährleisten kann. Somit ist der Import des Toxins in den sekretorischen Weg der Toxinproduzierenden Zelle - im Unterschied zu K28 - essentiell für den Immunitätsmechanismus des K1-Toxins. Interessanterweise führte die Expression des Precursors auch bei Co-Expression mit dem α -Derivat ohne ER-Importsequenz zu komplett immunen Zellen, obwohl hier keine direkte Interaktion der Moleküle untereinander stattfinden sollte. Diese Ergebnisse unterstützen bereits bestehende Hypothesen, welche die Immunität des Killertoxins K1 mit Interaktionen des Präprotoxins und bisher unbekanntem Effektorproteinen im sekretorischen Weg verknüpfen (Schmitt & Breinig, 2006, Breinig *et al.*, 2002, Valis *et al.*, 2006). Eine Hypothese der Immunität beruht auf einer Interaktion des Protoxins mit dem K1-Sekundärrezeptor Kre1p im Golgi der Killerhefe, so dass ähnlich zu K28 ein Proteinkomplex gebildet wird, der in der Vakuole degradiert wird; auf diese Weise sollte eine geringere Anzahl an Rezeptormolekülen an der Plasmamembran der Killerzelle zur Verfügung stehen (Sturley *et al.*, 1986; Tipper & Schmitt, 1991). Eine solche Beteiligung von Kre1p konnte bisher nicht untersucht werden, da Nullmutationen des entsprechenden Gens zu einer vollständigen Resistenz der jeweiligen Hefezellen gegen extrazellulär appliziertes Toxin führen. Durch Verwendung der konstruierten K1-Derivate konnte jedoch nach intrazellulärer Expression gezeigt werden, dass sich $\Delta kre1$ -Mutanten wie wildtypische Zellen verhalten. Zudem war in Co-Transformationsexperimenten der K1-Precursor in der Lage, eine vollständige funktionelle Immunität gegen die co-exprimierten α -Untereinheiten zu gewährleisten. Die Daten belegen somit, dass Kre1p weder für die toxische Wirkung der α -Untereinheit noch für die Vermittlung der funktionellen Immunität notwendig ist (Gier *et al.*, 2017). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Konstruktion von cytotoxischen K1-Derivaten eine substantielle Möglichkeit bietet, Deletionsmutanten auf K1 Immunität bzw. Toxizität zu testen und gleichzeitig potentielle Probleme der Zellwandkomposition zu umgehen. Somit stellen diese Derivate eine wertvolle Grundlage dar, um die molekularen Mechanismen der K1-Biologie näher zu untersuchen.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, unterschiedliche Mutationen im K1-Präprotoxin bzw. in den α -Derivaten vorzunehmen und so den Einfluss bestimmter struktureller Komponenten

auf die Funktionsweise bzw. die Prozessierung des Toxins zu analysieren. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Art des ER-Imports des Toxin-Precursors essentielle Auswirkungen auf die Ausbildung einer vollständigen Immunität hat, konnte der postulierte co-translationaler Import des K1-Toxin bisher nicht vollständig experimentell belegt werden. Aus diesem Grund und basierend auf den zuvor beschriebenen K1-Derivaten, wurden Substitutionen der Prä-Region mit Aminosäuresequenzen von post-translational importierten Proteinen durchgeführt. Hierbei wurden zum einen die entsprechende Sequenz des K28-Toxins sowie die ER-Signalsequenz des *Mating Factor a* (MFA) angefügt, dessen Import ebenfalls höchstwahrscheinlich post-translational abläuft (Breinig *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 1986); zusätzlich wurde die komplette *Leader*-Sequenz bestehend aus der Prä- und der Pro-Region mit den äquivalenten Regionen von K28 ausgetauscht. Untersuchungen hinsichtlich der Toxizität dieser chimären Konstrukte zeigten ein wildtypisches Phänotyp solange lediglich eine Untereinheit substituiert wurde. Für das Toxinderivat mit der Präpro-Region von K28 konnte ein Verlust der Toxizität gegen intakte Hefezellen sowie eine signifikante Einschränkung der biologischen Aktivität gegen Sphäroplasten beobachtet werden; hierbei führt wahrscheinlich die Kombination aus post-translationalem Import und der K28-Pro-Region zu einer deutlichen Störung der Toxinreifung. Die Expression von entsprechenden Letalkonstrukten zeigte keinen Einfluss der Präpro-Region auf den Selbstkillerphänotyp dieser Konstrukte. Nach extrazellulärer Applikation von wildtypischem K1-Toxin konnte die Ausbildung einer unvollständigen Immunität beobachtet werden, die sich in der Ausbildung einer Zone mit eingeschränktem Hefewachstum äußerte. Lediglich das Volllängentoxin, welches mit der K28-Pro-Region substituiert wurde, verhielt sich komplett immun. Die deutlichsten Phänotypen traten bei einer Co-Expression der chimären Letalkonstrukte mit dem wildtypischen K1-Volllängentoxin auf, wobei ein vollständiger Verlust der Immunität dokumentiert wurde. Aufgrund ihres schnellen Wachstums wird in Hefen und Bakterien wahrscheinlich der post-translationaler Import bevorzugt, da nur eine limitierte Anzahl an *Sec*-Komplexen bzw. *Sec*-Äquivalenten zur Verfügung steht. Ein co-translationaler Import erfolgt nach dieser Hypothese lediglich für einen Bruchteil der Proteine, die aufgrund ihrer Hydrophobizität im Cytoplasma akkumulieren würden, so dass K1 aufgrund seiner vielzähligen, stark hydrophoben Peptidsequenzen prädestiniert für diesen Transportweg wäre (Hegde & Bernstein, 2006; Jungnickel & Rapoport, 1995). Basierend auf den in dieser Arbeit durchgeführten Substitutionsanalysen der Präpro-Region wird ein vorrangiger co-translationaler ER-Import des K1-Precursors postuliert (**Abb. 50A**).

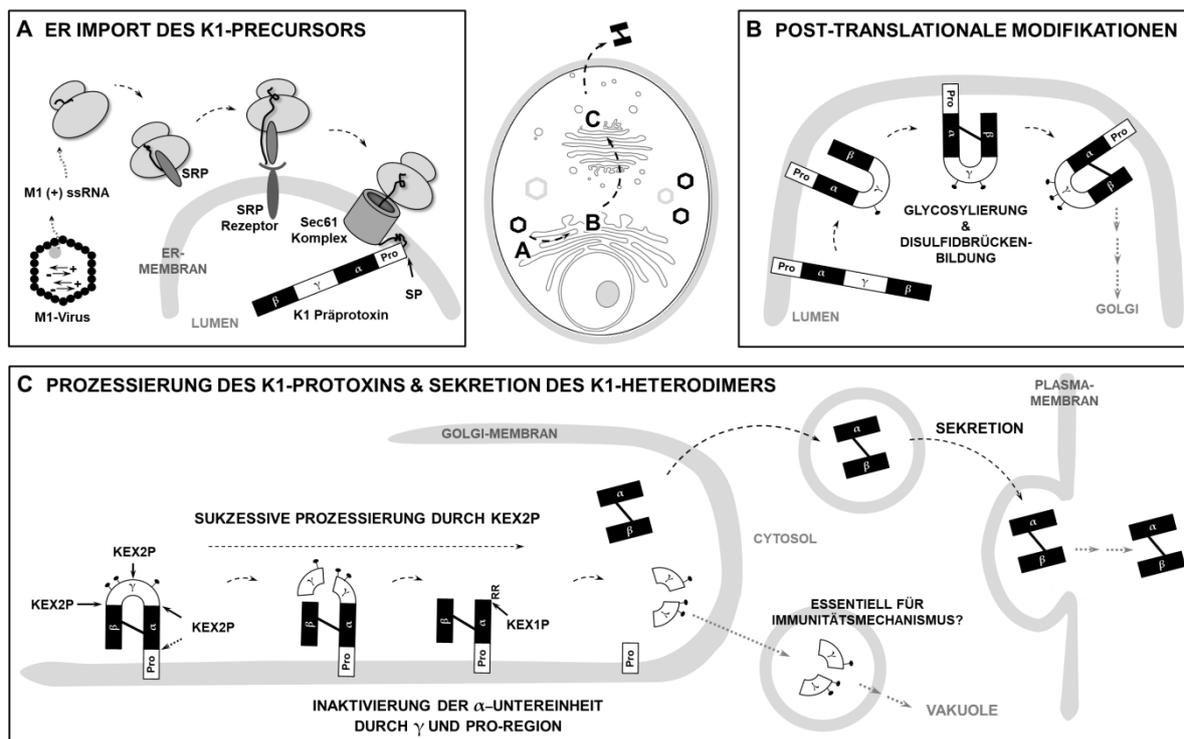


Abbildung 50: Hypothetisches Modell der Prozessierung des K1-Killertoxins im Sekretionsweg einer Killerhefe. A ER-Import des K1-Precursors. Nach Export von (+)ss-RNA-Molekülen aus der Virushülle der M₁-Viren werden diese von wirtseigenen Ribosomen als Template zur Translation verwendet. Im Anschluss an den co-translationalen Import in das ER der Killerhefe wird die Prä-Region des Precursors durch den Signalpeptidase-Komplex (SP) entfernt. **B Post-translationale Modifikationen.** Im ER der Wirtszelle erfolgt die Glycosylierung der γ -Sequenz sowie die Ausbildung einer einzelnen intermolekularen Disulfidbrücke, welche die Haupttoxinuntereinheiten α und β kovalent verbindet. Im Anschluss wird das Protoxin anterograd zum Golgi-Apparat transportiert. **C Prozessierung des K1-Protoxins und Sekretion des K1-Heterodimers.** In späten Golgi-Kompartimenten erfolgt die weitere Prozessierung des K1-Vorläufers durch die proteolytische Aktivität der Endopeptidase Kex2p. Aufgrund der schwachen Kex2p-Erkennungssequenz (Pro-Arg) am N-Terminus der α -Untereinheit kann postuliert werden, dass zunächst die γ -Sequenz proteolytisch abgespalten wird. Basierend auf Untersuchungen dieser Arbeit konnte zudem der intramolekularen Kex2p-Erkennungssequenz in γ eine größere Bedeutung in der Prozessierung des Toxins sowie der Vermittlung einer vollständigen Immunität zugeschrieben werden. Das dargestellte Modell postuliert eine Inaktivierung der toxischen α -Untereinheit durch die Pro-Region und die 39 verbleibenden AS der γ -Sequenz, welche noch nicht proteolytisch entfernt wurden. Nach abgeschlossener Kex2p-Prozessierung liegen die di-basischen Argininreste am C-Terminus von α frei, welche anschließend durch die Aktivität der Carboxypeptidase Kex1p abgespalten werden. Letztendlich wird das reife K1-Heterodimer vesikulär zur Plasmamembran transportiert und sezerniert; unterschiedliche Studien implizieren einen Transport der Peptide der γ -Untereinheit zur Vakuole der Wirtszelle, welcher auf eine signifikante Rolle dieser für die Vermittlung der Immunität hinweisen könnte (verändert nach Gier *et al.*, 2019d; basierend auf Tipper & Bostian, 1984; Boone *et al.*, 1986).

Obwohl das K1-Toxin auch durch post-translationalen Import nicht seine toxische Wirkung einbüßt, zeigte die Analyse der Immunitätsvermittlung, dass nicht genügend Toxinmoleküle im Golgi der Zelle vorhanden sind, um eine vollständige Immunität zu gewährleisten sobald additives Toxin extrazellulär appliziert wird. Dies wird besonders durch die Co-Transformationsexperimente verdeutlicht, in denen das wildtypische Precursormolekül und die mutierten Letalkonstrukte unterschiedlich in den sekretorischen Weg importiert werden und folglich der Toxinvorläufer nicht in der Lage ist, die Hefezelle vor der toxischen

Wirkung der α -Derivate zu schützen. In analog durchgeführten Experimenten konnte ein Austausch der K28-Prä-Region mit der entsprechenden K1-Untereinheit ebenfalls einen solchen Phänotyp hervorrufen, so dass von unterschiedlichen Prozessierungswegen beider Killertoxine ausgegangen werden kann (Breinig *et al.*, 2006). In weiterführenden Versuchen könnten die in dieser Arbeit analysierten Konstrukte in einem *Low Copy*-Vektorsystem untersucht werden, um potentielle Artefakte der in diesen Experimenten eingesetzten hohen Expressionsrate des eingesetzten *Multi Copy*-Plasmids auszuschließen.

Im weiteren Verlauf der Prozessierung des K1-Precursors erfolgt nach proteolytischer Abspaltung der Prä-Region die Glycosylierung der γ -Sequenz. Diese Untereinheit umfasst 86 Aminosäuren und enthält insgesamt drei potentielle Glycosylierungsstellen sowie eine intramolekulare Kex2p-Schnittstelle mit di-basischer Erkennungssequenz. In dieser Arbeit wurde durch eine sukzessive Deletion der Glycosylierungsstellen ihr Einfluss auf die Prozessierung des Precursors untersucht. Entgegen früherer Untersuchungen, die einen nahezu vollständigen Stopp der Toxinsekretion nach Behandlung der Zellen mit Tunicamycin beobachten konnten, führte die Deletion der Glycosylierungsstellen in der γ -Sequenz überraschenderweise zu keiner Einschränkung der biologischen Aktivität des sezernierten Toxins (Bussey *et al.*, 1983); ebenso konnte keine verminderte Sekretionsrate in den Mutanten nachgewiesen werden. Weiterhin konnte auch keine Einschränkung in der Vermittlung der Immunität für Transformanten, welche auf diese Weise mutierte Toxin-Precursor exprimierten, gezeigt werden. Das Antibiotikum Tunicamycin blockiert den ersten Schritt der N-Glycosylierung und führt somit durch eine Akkumulation fehlgefalteter Proteine zu ER-Stress und folglich zur Initiierung der *Unfolded Protein Response* der Zelle (Torres-Quiroz *et al.*, 2010). Aus diesem Grund könnte die in früheren Experimenten beobachtete ausbleibende Sekretion von aktiven K1-Toxinmolekülen auf einem generellen Stopp der Translation begründet sein, welcher eine physiologische Reaktion der Zelle auf ER- oder oxidativen Stress darstellt und dazu dient, die intrazelluläre Proteinhomöostase wiederherzustellen (Wu *et al.*, 2014). Weiterhin sind die Peptidasen Kex2p und Kex1p stark glycosylierte Proteine, so dass eine generelle Inhibierung der N-Glycosylierung durch Zugabe von Tunicamycin zu einer signifikanten Fehlfaltung bzw. Degradation dieser Enzyme führen könnte, die u. a. essentiell für die Reifung des Toxinprecursors sind. Killerhefen mit Mutationen in diesen Genen sind immun gegen extrazellulär appliziertes Toxin, können allerdings selbst kein reifes Heterodimer sezernieren (Schmitt, 1995; Schmitt & Tipper, 1995). Da eine Glycosylierung des K1-Protoxins *in vitro* mittels Western Blot

und einer Endoglycosidase H-Behandlung nachgewiesen werden konnte, hat diese posttranslationale Modifikation möglicherweise keine essentiellen Implikationen für die weitere Reifung des K1-Toxins, sondern erleichtert lediglich dessen Prozessierung (Bussey *et al.*, 1983), (**Abb. 50**). Das Ausbleiben der erwarteten verringerten Toxinsekretion könnte auf der Verwendung des *Multi Copy*-Vektorsystems zurückgeführt werden, welches diesen Phänotyp möglicherweise überlagert. Aus diesem Grund wäre eine Subklonierung dieser Toxinmutanten in das *Low Copy*-Plasmid pRS316 eine Möglichkeit die Beobachtungen der durchgeführten Experimente ergänzend zu untermauern.

Nach kovalenter Verbindung der Haupttoxinuntereinheiten α und β durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke wird das K1-Protoxin anterograd zum Golgi-Apparat der Wirtszelle transportiert. Zusätzlich zu ihrer Chaperon-ähnlichen Funktion kann der γ -Sequenz eine wichtige Bedeutung in der Vermittlung der Immunität zugeschrieben werden, welche in dieser Arbeit weiter beleuchtet werden sollten. Aus diesem Grund wurde neben einem vollständigen Austausch der γ -Sequenz durch die analoge Untereinheit des K28-Toxins auch die intramolekulare Kex2p-Erkennungssequenz in der Mitte dieser Region durch einen Aminosäureaustausch (K₁₈₇L) zerstört. Obwohl die γ -Untereinheiten der Killertoxine K1 und K28 keinerlei Sequenzhomologie aufweisen, wurde durch eine Substitution eine vollständige Immunität der entsprechenden Transformanten gegen extrazellulär appliziertes K1-Toxin beobachtet. Allerdings waren Hefezellen, die dieses Konstrukt exprimierten, nicht mehr in der Lage, biologisch aktives Toxin zu sezernieren; ein solcher Phänotyp konnte ebenfalls für den analogen Austausch der γ -Untereinheit des K28-Toxins gezeigt werden (Breinig *et al.*, 2006). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass nicht die exakte Aminosäuresequenz, sondern die physikochemischen Eigenschaften der C-terminalen Erweiterung der α -Untereinheit elementar zur Immunitätsvermittlung sind.

Eine Mutation der erwähnten intramolekularen Kex2p-Schnittstelle, die ebenfalls in der γ -Untereinheit des K28-Killertoxins vorzufinden ist, führte zu keiner Verringerung der biologischen Aktivität des sezernierten K1-Toxins. Allerdings konnten leichte Einschränkungen in der funktionellen Immunität verzeichnet werden, wenn extrazellulär weiteres K1-Toxin zugegeben wurde. Weiterhin führte eine Co-Expression der toxischen α -Untereinheit mit einem auf diese Weise mutierten Precursor-Molekül zu einem vollständigen Verlust der funktionellen Immunität. Dies deutet darauf hin, dass eine solche Prozessierung der γ -Region durch Kex2p im Golgi elementar ist, sobald freie α -Moleküle im Golgi vorhanden sind. Zur weiteren Untersuchung der Rolle dieser Schnittstelle wurden

in dieser Arbeit die bereits zuvor beschriebenen Letalkonstrukte C-terminal entweder um die gesamte γ -Untereinheit oder um 39 Aminosäuren dieser Sequenz erweitert und intrazellulär exprimiert. Nach Expression dieser K1-Derivate konnte zwar eine Abschwächung des durch α induzierten Selbstkillerphänotyps beobachtet werden, eine vollständige Immunität kann allerdings erst durch Import der Konstrukte in den sekretorischen Weg erreicht werden; hierbei konnte wiederum kein Unterschied zwischen der verkürzten und der vollständigen γ -Untereinheit festgestellt werden. Vorangegangene Analysen zur Vermittlung der Immunität des Killertoxins K1 konnten ebenfalls zeigen, dass die ersten 31 Aminosäuren der γ -Sequenz am C-Terminus der toxischen α -Untereinheit ausreichen, um die Ausbildung eines funktionellen Immunitätsmechanismus zu gewährleisten (Zhu *et al.*, 1993). Aus diesem Grund unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur frühere Untersuchungen, sondern belegen erneut die Bedeutung der intramolekularen Kex2p-Schnittstelle, deren Prozessierung eben diese 39 Aminosäuren am C-Terminus der α -Untereinheit hinterlässt (**Abb. 50C**). Im späten Golgi-Kompartiment der Wirtszelle erfolgt neben der Prozessierung der γ -Untereinheit ebenfalls eine Kex2p-abhängige Abspaltung der Pro-Region. Im Folgenden wurden Punktmutationen am C-Terminus der Pro-Region eingebracht, welche die Effizienz dieser Kex2p-Prozessierung signifikant verändern sollten. Für diese Konstrukte wurde deutlich, dass eine Zerstörung der Schnittstelle eine Inhibierung der toxischen Wirkung der α -Untereinheit zu Folge hat; im Gegensatz dazu hatte eine Verstärkung der Kex2p-Erkennungssequenz keine signifikanten Effekte. Bisher postulierte Modelle zur Prozessierung des K1-Precursors gehen von einer Verankerung des Protoxins in der Membran durch die Pro-Region aus, welche höchstwahrscheinlich auf den stark hydrophoben Eigenschaften dieser Untereinheit beruht (Tipper & Bostian, 1984; Boone *et al.*, 1986). Basierend auf der Gesamtheit der erhaltenen Daten dieser Arbeit und im Einklang mit früheren Untersuchungen wird ein Modell zur Toxinprozessierung und Immunitätsvermittlung im späten Golgi der Killerhefe postuliert, welches elementar auf einer graduellen Kex2p-abhängigen Prozessierung des K1-Precursors basiert. Durch die sukzessive proteolytische Aktivität dieser Endopeptidase wäre eine Inaktivierung der toxischen α -Untereinheit durch Teile der γ -Sequenz sowie der Pro-Region bis hin zu späten Golgi-Kompartimenten denkbar, wodurch die Toxin-produzierende Zelle vor der letalen Wirkung geschützt wäre (**Abb. 50C**). In zukünftigen Untersuchungen könnten unterschiedliche Peptidsequenzen an den N-Terminus der α -Untereinheit angefügt werden, um diese Hypothese weiter zu charakterisieren; so könnte es sich einerseits um eine rein sterische Inhibierung von α handeln, andererseits kann ein spezifischer Mechanismus,

der die Killerhefe vor der toxischen Wirkung dieser Untereinheit schützt, nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin könnte die Induktion des Selbstkillerphänotyps eines cytosolisch vorliegenden K1-Derivats, welches aus der α -Untereinheit, der K1-Pro-Region sowie mindestens 39 Aminosäuren der γ -Untereinheit aufgebaut ist, untersucht werden.

Zur Prozessierung des K1-Heterodimers wird neben der Endopeptidase Kex2p auch eine proteolytische Aktivität durch die Carboxypeptidase Kex1p benötigt. Nach Abspaltung der γ -Untereinheit im späten Golgi verbleiben zwei Argininreste am C-Terminus der α -Untereinheit, die potentiell durch Kex1p entfernt werden könnten; eine Abspaltung der di-basischen Reste konnte sowohl für den α -Faktor als auch für das Killertoxin K1 gezeigt werden (Cooper & Bussey, 1989), (**Abb. 50C**). Im Fall des Killertoxins K28 spielt dieses Enzym eine essentielle Rolle zur Aktivierung des reifen Heterodimers, da das HDEL-Motiv vor der enzymatischen Spaltung durch den Carboxy-terminalen Argininrest maskiert vorliegt. In dieser Arbeit wurde unter Verwendung entsprechender Letalkonstrukte die physiologische Relevanz der Argininreste näher untersucht. Eine intrazelluläre Expression der α -Derivate mit einem oder zwei C-terminalen Argininen führte zu keiner Veränderung in der Ausprägung des Selbstkillerphänotyps. Eine deutliche Abweichung vom wildtypischen Phänotyp konnte allerdings bei einer Co-Expression dieser Letalkonstrukte mit Volllängentoxin beobachtet werden. Der Verlust der Immunität fiel hierbei besonders schwerwiegend aus, sobald die Letalkonstrukte eine N-terminale ER-Importsequenz besaßen. Unter physiologischen Bedingungen können solche α -Derivate nicht im frühen sekretorischen Weg auftreten, so dass es sich hier um ein artifizielles System handelt. Dennoch impliziert der beobachtete Phänotyp eine signifikante Interferenz der positiven Ladungen hinsichtlich einer möglichen Interaktion der α -Derivate mit dem K1-Präprotoxin. Da die Porenbildung durch die di-basischen Reste nicht behindert ist, könnten weitergehende Untersuchungen die physiologische Relevanz einer Kex1p-abhängigen Prozessierung des K1-Toxins weiter untersuchen. Beispielsweise könnten die Argininreste durch Histidine ersetzt werden, die zwar ebenfalls eine positive Ladung tragen, allerdings keine Substrate für Kex1p darstellen.

Nach abgeschlossener Prozessierung wird das reife K1-Heterodimer vesikulär verpackt, zur Plasmamembran transportiert und schlussendlich sezerniert. Zusätzlich implizieren unterschiedliche Studien eine Beteiligung des Golgi-Vakuolen-*Pathways* an der Vermittlung der Immunität, so dass in Einklang mit den Daten dieser Arbeit ein Transport

der Peptide der γ -Untereinheit zur Vakuole postuliert wird (Sturley *et al.*, 1986; Tipper & Schmitt, 1991; Valis *et al.*, 2006). Die Verwendung von Hefestämmen mit Deletionen in Genen des vesikulären Transports bzw. unterschiedlicher vakuolärer Proteine, vor allem der V-ATPase, zeigte einen deutlich hypersensitiven Phänotyp dieser Zellen. Obwohl diese Beobachtungen die Hypothese unterstützen, sollte in zukünftigen Analysen unter Verwendung γ -spezifischer Antikörper die genaue Lokalisation dieser Untereinheit untersucht werden. Weiterhin konnte bis dato kein Mechanismus beschrieben werden, welcher eine Einlagerung der α -Untereinheit in die Lipidmembran der Vesikel verhindert. Die Toxizität von K1 ist elementar von der korrekten Lokalisation seines Sekundärrezeptors Kre1p abhängig, welcher als GPI-verankertes Protein größtenteils in *Lipid Rafts* organisiert ist (Bagnat *et al.*, 2000). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass sich das ionophore Toxin vermehrt in solche Ergosterol-reichen Bereiche einlagert, die fast ausschließlich an der Plasmamembran zu finden sind (van Meer *et al.*, 2008). Basierend auf dieser Annahme und der generellen Asymmetrie biologischer Doppelmembranen könnte die Insertion der α -Untereinheit möglicherweise durch die Lipidkomposition der Vesikel unterbunden bzw. deutlich erschwert werden. Vorangegangene Untersuchungen bezüglich der K1-induzierten Porenbildung konnten nicht nur die ionophore Wirkung des Toxins gegen Sphäroplasten sensitiver Hefen, sondern auch gegen artifizielle Membranen zeigen (Martinac *et al.*, 1990). Da zur Präparation der Liposomen allerdings eine undefinierte Mischung diverser Lipide verwendet wurde, könnten Artefakte in der *Patch Clamp*-Messung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Durch den Einsatz weiterentwickelter Methoden, wie beispielsweise der Verwendung so genannter planarer *Lipid Bilayer*, könnten diese Experimente unter kontrollierten Bedingungen wiederholt werden, wobei zudem nicht nur die Lipidkomposition der eingesetzten Membran genau definiert, sondern auch unterschiedliche Membranzusammensetzungen analysiert werden können.

Analyse der Disulfidbrücken im reifen K1-Heterodimer

Die Killertoxine K1 und K28 stellen beide klassische A/B-Toxine dar, die nach vollständiger Prozessierung im sekretorischen Weg der Wirtszelle jeweils aus einer toxischen α -Untereinheit und einer für die Bindung an die Zielzelle zuständigen β -Untereinheit, die über mindestens eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, bestehen. Da das K28-Vorläuferprotein lediglich einen Cysteinrest in der α -Untereinheit besitzt, besteht nur die Möglichkeit der Ausbildung einer einzelnen Disulfidbrücke

zwischen den Haupttoxinuntereinheiten, so dass die verbleibenden drei Cysteine der β -Untereinheit nicht in die intermolekulare Verbindung der Untereinheiten involviert sind. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass neben einer intramolekularen Disulfidbrücke der verbleibende freie Thiolrest eine essentielle Rolle im pH-abhängigen letalen Mechanismus des Toxins spielt (Suzuki *et al.*, 2017). So wird nach Erkennung des HDEL-Motivs am C-Terminus der β -Untereinheit durch den Sekundärrezeptor Erd2p das Toxindimer endocytotisch internalisiert, retrograd transportiert und schließlich ins Cytoplasma transloziert. Während der Passage durch den sekretorischen Weg nutzt das K28-Toxin die physiologischen pH-Unterschiede innerhalb der zellulären Kompartimente für seine toxische Wirkung. Im neutralen pH des ER werden die freien Thiolreste der β -Untereinheit deprotoniert und sind somit in der Lage über einen nukleophilen Angriff eine Umlagerung der Disulfidbrücken des Toxins zu initiieren. Dadurch kommt es letztendlich zur Freisetzung der α -Untereinheit im Cytosol, welche ihre toxische Wirkung im Zellkern der Zielzelle ausüben kann; die β -Untereinheit hingegen wird ubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Riffer *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2016).

Im Unterschied zu K28 besitzt das K1-Toxin in jeder Haupttoxinuntereinheit jeweils drei Cysteinreste, C92, C95, C107 in α und C239, C248, C312 in β . Das bisherige Strukturmodell des Toxins sieht drei Disulfidbrücken mit den Thiol-Paarungen C92-C248, C95-C312 und C107-C239 vor, wobei diese Daten allerdings lediglich auf berechneten Sequenzähnlichkeiten beruhen und bislang nicht experimentell bestätigt werden konnten. Prinzipiell würde diese starke kovalente Verbindung beider Untereinheiten einen potentiellen Umlagerungsmechanismus, der die toxische α -Untereinheit während der Porenbildung freisetzen könnte, deutlich erschweren. Bisher sind für den Mechanismus der Toxizität von K1 lediglich die Energie-abhängige Disruption der Plasmamembran und der damit verbundene Protoneninflux bzw. Verlust von intrazellulären Metaboliten weitergehend beschrieben. Allerdings konnte bisher weder gezeigt werden, ob die β -Untereinheit während der Bildung der Kationen-selektiven Poren weiterhin mit α verbunden bleibt, noch ob einzelne Toxinmoleküle bzw. α -Monomere in das Innere der Zielzelle gelangen und dort den toxischen Effekt beschleunigen bzw. vermitteln können.

Unter Verwendung unterschiedlicher K1-Derivate, die eine Einzel-, Doppel- oder Tripelmutation der Cysteine im Toxinprecursor tragen, sollte nicht nur die Anzahl, sondern auch die exakte Paarung der im K1-Heterodimer ausgebildeten Disulfidbrücken untersucht werden. Interessanterweise sind die Cysteinreste der α -Untereinheit in einem kleinen hydrophilen Sequenzbereich lokalisiert, der von zwei stark hydrophoben Bereichen flankiert

wird, die vermutlich essentiell für die Insertion der Untereinheit in die Plasmamembran sind. Aus diesem Grund sollte der Einfluss der Cystein-Substitutionen auf die Toxizität und Immunität untersucht werden. Des Weiteren wurden Cystein-mutierte α -Letalkonstrukte konstruiert und intrazellulär im sensitiven Hefestamm BY4742 exprimiert, so dass potentielle Effekte der Substitutionen auf den toxischen Effekt, d. h. die Ausbildung von Poren, analysiert werden konnten.

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen der Substitutionsanalyse wird ein neues Strukturmodell postuliert, welches die Ausbildung von lediglich einer Disulfidbrücke zwischen den K1-Untereinheiten α und β vorsieht, die durch kovalente Verbindung der Cysteine C92 und C239 entsteht. Auf diese Weise können hypothetisch vier verschiedene Redoxzustände der Thiolreste, die nicht an der Bildung der Disulfidbrücken beteiligt sind, vorliegen (**Abb. 51**).

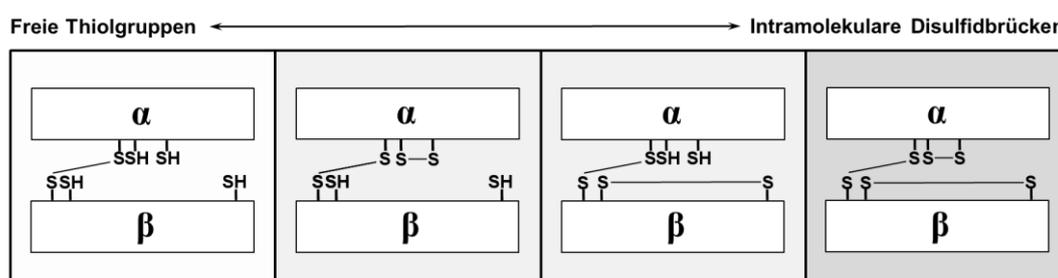


Abbildung 51: Schematische Darstellung des möglichen Thiol-Arrangements im reifen K1-Heterodimer. Nach Ausbildung der intermolekularen Disulfidbrücke zwischen C92 und C239 verbleiben vier Cysteinreste, die nicht an der Verbindung der Untereinheiten beteiligt sind. Sie können entweder als freie Thiolgruppen oder als intramolekulare Disulfidbrücken vorliegen (verändert nach Gier *et al.*, 2019b).

Neben der Möglichkeit, dass die verbleibenden vier Cysteine C95 und C107 in α bzw. C248 und C312 in β als freie Cysteine vorliegen, kann zudem die Ausbildung von einer oder zwei intramolekularen Disulfidbrücken innerhalb der Toxinuntereinheiten nicht ausgeschlossen werden, so dass ein Zyklus zwischen oxidierter und reduzierter Form möglich wäre (**Abb. 51**). Allerdings sind weitere Untersuchungen hinsichtlich eines potentiellen Thiol-Switches, wie er für K28 beobachtet wurde, notwendig, die nicht nur den tatsächlichen Redox-Status der Cysteine bestimmen, sondern auch die eigentlich Relevanz für den toxischen Mechanismus des K1-Killertoxins belegen könnten.

Die Untersuchung der Toxinsekretion sowie der Vermittlung der funktionellen Immunität der mutierten K1-Derivate zeigte, dass der Mechanismus der Immunität unabhängig von einer eigentlichen Bildung eines Toxin-Heterodimers ist; Transformanten, die eine K1-

Version mit vollständig substituierten Cysteinen der β -Untereinheit exprimieren, bildeten eine komplett funktionelle Immunität gegen extern appliziertes Toxin aus. Generell konnte dieser Phänotyp für alle Mutanten der β -Untereinheit beobachtet werden, wodurch mit Hilfe dieser Analyse erneut bestätigt werden konnte, dass β keinen Einfluss auf die Ausbildung der funktionellen Immunität hat. Obwohl keines der β -mutierten K1-Derivate eine toxische Wirkung gegen intakte Zellen ausbilden konnte, wurde die Sekretion eines K1-Heterodimers für die Einzelmutanten C248S sowie C312S sowie die korrespondierende Doppelmutante C248-312S nachgewiesen. Zusätzlich wurden toxische Effekte auf sphäroplastierte Zellen eines sensitiven Hefestammes, die einen Toxinprecursor mit der Mutation C248S bzw. C248-312S exprimieren, nachgewiesen. Dies impliziert deutliche Interferenzen in der β -vermittelten Bindung an die Zellwandstrukturen der Zielzelle, welche durch enzymatische Entfernung deutlich erleichtert wurde; gleichzeitig scheint der Cysteinrest C312 allerdings auch für die Bindung des Toxins an die Plasmamembran notwendig zu sein (**Abb. 52**).

Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Substitution der Cysteine C95 und C107 nicht nur zu einem vollständigen Verlust der Toxinsekretion, sondern auch der funktionellen Immunität führt. Diese Beobachtung bestätigt, dass die α -Untereinheit sowohl für den toxischen Effekt des K1-Toxins, als auch für die Ausbildung der intrinsischen Immunität notwendig ist und unterstützt so die Hypothese der Multifunktionalität dieser Toxinuntereinheit. Lediglich die Einzelmutteration des Cysteins C92 führte zur Produktion einer K1-Variante, die in der Lage war, Immunität gegen extern appliziertes Toxin zu gewährleisten. Eine frühere Studie, welche die biologische Aktivität sowie die Vermittlung der Immunität von mutierten K1-Toxinvarianten analysierte, konnte ebenfalls ein Ausbleiben der Sekretion des K1-Heterodimers beobachten, sobald die α -helikalen Strukturen in der α -Untereinheit mutiert wurden; unter anderem wurden in dieser Studie auch die Cysteinreste C92 und C312 mutiert. Hierbei führte die Substitution des Cysteins in der β -Untereinheit mit einem Leucinrest zur Sekretion einer Toxinvariante, die in der Lage war sphäroplastierte Zellen abzutöten und sich hierbei vollständig immun gegen extern appliziertes Toxin verhielt. Dementgegen führte ein Austausch des Cysteins C92 mit der Aminosäure Tyrosin zu einem vollständigen Verlust der Immunität sowie der biologischen Aktivität (Zhu & Bussey, 1991). Im Zusammenhang mit den Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen impliziert dies, dass sowohl die Nettoladung als auch die Sekundärstruktur der α -Untereinheit für den Mechanismus der funktionellen Immunität von großer Bedeutung sind.

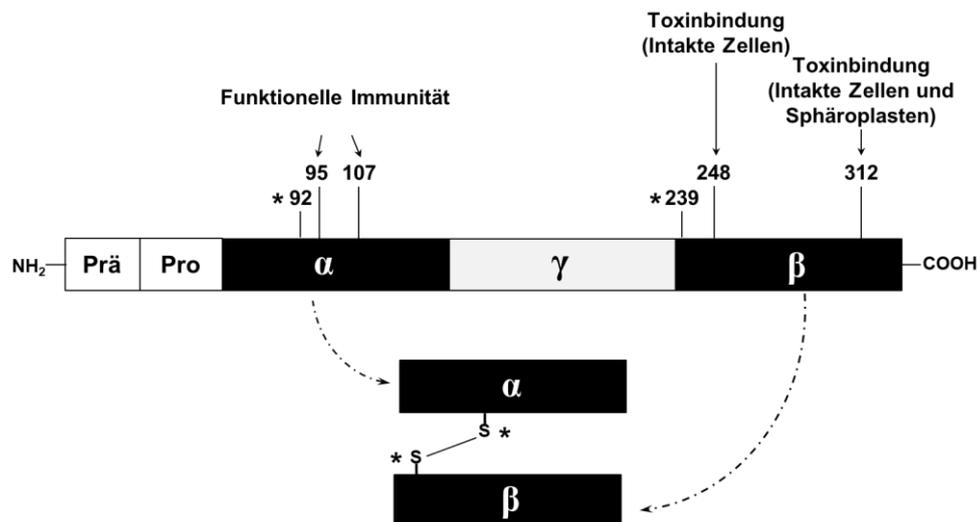


Abbildung 52: Potentielle Funktionen der Cysteinreste in der Funktionsweise des K1-Kilertoxins. Die Ergebnisse der durchgeführten Cystein-Substitutionen im K1-Precursormolekül weisen auf die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C92 und C239 hin (Markiert mit *) hin. Zusätzlich könnte der beobachtete Verlust der Immunität nach Substitution der Cysteine C95 und C107 in der α -Untereinheit auf eine direkte oder indirekte Beteiligung an der Vermittlung der Immunität hindeuten. Die Substitution der Cysteine in der β -Untereinheit resultierten zwar in einem Verlust der Toxizität gegen intakte Hefezellen (C248) bzw. sphäroplastierte Zellen (C248, C312), allerdings waren diese Mutanten vollständig immun (verändert nach Gier *et al.*, 2019b).

Zusammenfassend wurde durch die systematische Substitution der Cysteinreste im K1-Volllängentoxin die Ausbildung von lediglich einer Disulfidbrücke im reifen Heterodimer anstelle der bisher in der Literatur beschriebenen drei kovalenten Verbindungen nachgewiesen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Cysteine C95 und C107 direkt oder indirekt am Mechanismus der intrinsischen Immunität des K1-Killertoxins beteiligt sind (**Abb. 52**). Demnach wäre neben einer direkten Beteiligung der Cysteinreste an dem Abwehrmechanismus auch eine Gewährleistung einer korrekten Faltung der α -Untereinheit denkbar, die beispielsweise zur Interaktion mit der γ -Untereinheit benötigt wird. Zukünftige Untersuchungen könnten sich demnach durch Verwendung von K1- $\alpha\gamma$ -Derivaten auf die Interaktion von Cystein-mutierten α -Derivaten mit der γ -Untereinheit fokussieren. Die Bedeutung der γ -Sequenz konnte nicht nur bereits in früheren Studien verdeutlicht werden, sondern wurde auch in dieser Arbeit bestätigt, wobei die exakte Rolle dieser Untereinheit immer noch ungeklärt bleibt (Zhu *et al.*, 1993). Im Unterschied hierzu sind die beiden verbleibenden Cysteine der β -Untereinheit C248 und C312 an der Toxinbindung des K1-Dimers an der Zellwand bzw. der Plasmamembran beteiligt. Allerdings schien auch hier eher die Sekundärstruktur, die durch die Cysteinreste stabilisiert wird, essentiell für die Interaktion des Toxins mit der Zellwand bzw. der Plasmamembran gewesen zu sein, da eine

Doppelmutation der beiden Cysteine eine Toxinvariante hervorbringt, die in der Lage ist, sphäroplastierte Zellen abzutöten. Generell sollten die hier gewonnenen Daten durch weitere Substitutionsanalysen mit unterschiedlichen Aminosäuren validiert werden. Obwohl die polare Aminosäure Serin hinsichtlich der Hydrophobizität die beste Wahl zur Substitution eines Cysteinrests ist, können Artefakte in der Ausbildung des Phänotyps nicht ausgeschlossen werden. Da kein direkter Einfluss der Serin-Substitution auf die Porenbildung *per se* beobachtet werden konnte, besteht weiterhin die Möglichkeit, dass beispielsweise die Tertiärstruktur, die generelle Funktionsweise oder die Stabilität des Toxinprecursors gestört wurden. Insgesamt scheint das K1-Toxin sowohl in seiner Wirkungsweise als auch in der Ausbildung der Immunität sehr stark von der sterischen Konfiguration und der Nettoladung der Aminosäurestruktur abhängig zu sein. Zukünftige Untersuchungen könnten eine Charakterisierung der Phänotypen nach Substitution mit kleineren nicht-polaren Aminosäuren wie Alanin oder Valin in Betracht ziehen, da somit potentielle Effekte der Aminosäureseitenketten beleuchtet werden könnten, die nicht direkt mit der Ausbildung der Disulfidbrücken zusammenhängen. Weiterhin stellt vor allem die Aufklärung der K1-Tertiärstruktur die beste Möglichkeit dar, um das hier postulierte Modell zu bestätigen. Zudem können anhand einer Strukturanalyse auch zielgerichtete Substitutionen bestimmter Aminosäuren in spezifischen Positionen innerhalb ausgewählter Peptidregionen durchgeführt werden, um die Funktionsweise des K1-Killertoxins weiter zu beleuchten. Dennoch geben die in dieser Arbeit gewonnenen Daten wertvolle Hinweise auf den bisher unbekanntem Mechanismus des Killertoxin K1 sowie die Ausbildung der funktionellen Immunität in Toxin-produzierenden Zellen.

Zeitabhängige Adaptation des Transkriptom eines sensitiven Stammes

Mikroorganismen benötigen ein breites Spektrum an zellulären Anpassungsmechanismen, die sie vor unterschiedlichen Umwelteinflüssen wie osmotischen oder oxidativen Stresssituationen schützen. Aus diesem Grund ist eine effektive Regulation des Transkriptom essentiell, um innerhalb kurzer Zeit auf Änderungen der extrazellulären Begebenheiten zu reagieren. Zur Untersuchung der transkriptionellen Adaptation sensitiver Zellen auf die Applikation von K1-Killertoxin wurde eine RNA-Seq-Analyse durchgeführt, die vor allem eine zeitabhängige Auflösung der de-regulierten zellulären Prozesse auf mRNA-Ebene ermöglichen sollte. Im Unterschied zum ebenfalls ionophoren Toxin

Zygocin, welches bereits kurz nach Applikation die Plasmamembranintegrität von sensitiven Zellen zerstört, konnte für das K1 eine deutliche *Lag*-Phase zwischen der Zugabe des Toxins und dem Eintritt eines nachweisbaren toxischen Effekts gezeigt werden (Bussey, 1991; Gier *et al.*, 2019a). Diese Beobachtung impliziert nicht nur einen komplexen Mechanismus von K1, sondern unterstützt auch die Vermutung, dass sensitive Zellen Abwehrmechanismen besitzen, die sie zumindest über einen gewissen Zeitraum vor der toxischen Wirkung des Killertoxins schützen können. Die Analyse der Transkriptom-Kinetik des verwendeten sensitiven Hefestammes zeigte signifikante Änderungen auf Expressionsebene, die durch Zugabe des viral codierten Toxins hervorgerufen wurden (**Abb. 53**), (Gier *et al.*, 2019a).

Die Ergebnisse zeigten hierbei eine sehr schnell eintretende negative Regulation von Genen beider ribosomalen Untereinheiten bzw. von generellen RNA-spezifischen Prozessen, die eine typische zelluläre Stressreaktion darstellt und für unterschiedlichste Stresssituationen bereits beobachtet werden konnte (Warner, 1999; Gasch *et al.*, 2000). Die negative Regulation ribosomaler Komponenten war hierbei über die Zeit stabil und stellt wahrscheinlich eine Anpassung an eine generelle Verringerung der Genexpression und der Proteinsynthese zum Vorteil der Translation von Stressproteinen dar (Jelinsky & Samson, 1999). Dementsprechende Änderungen in der Expressionsstärke von Genen der generellen Stressantwort sowie der osmotischen und oxidativen Schockantwort konnten ebenfalls beobachtet werden. In der Bäckerhefe sind insgesamt fünf Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalwege (*MAPK-Pathways*) bekannt, von denen zwei, der *High Osmolarity Glycerol (HOG)-Pathway* sowie der *Cell Wall Integrity (CWI)-Pathway*, die zelluläre Antwort auf Stress durch die gezielte Regulation von Signalkaskaden steuern (Qi & Elion, 2005). Der *CWI-Pathway* wird hierbei hauptsächlich durch Zellwandstress induziert und kumuliert in der Aktivierung der MAPK Stl2p (Levin, 2005). Der hoch konservierte *HOG-Pathway* stellt eine der zentralen Signalkaskaden zur Modulierung der osmotischen Stressantwort dar und führt zur Aktivierung der MAPK Hog1p. Diese Kinase ist nach dualer Phosphorylierung durch die MAPKK Pbs2p in der Lage, verschiedene cytoplasmatische und Zellkern-spezifische Antworten zu regulieren, um den zellulären Metabolismus an osmotischen Stress zu adaptieren (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999). Mit Ausnahme von Stl2p wurde in der Transkriptomanalyse keine signifikante differentielle Expression von Genen nachgewiesen, die für Kinasen dieser beiden *Pathways* codieren. Da die Regulation von MAPK-Signalkaskaden hauptsächlich durch Phosphorylierung moduliert wird, ist die ausbleibende direkte transkriptionelle Adaptation nicht überraschend. Allerdings wurde eine

positive Regulation der Transkriptionsfaktoren Msn4p bzw. Swi4p nach K1-Zugabe verzeichnet. Msn4p und sein Paralog (Msn2/4p) werden nach Phosphorylierung durch Hog1p in den Nucleus transloziert und binden dort an so genannte *Stress Response Elements* (*STRE*), die Teil vieler Stress-assoziiierter Gene sind (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt & McEntee, 1996; Gorner *et al.*, 1998). Swi4p ist ein Transkriptionsaktivator der an G1-spezifische Gene bindet und zudem nach Aktivierung durch den *CWI-Pathway* die Genexpression von Genen der DNA-Reparaturmaschinerie steuert (Workman *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde auch eine Hochregulation vieler Zielgene beider Transkriptionsfaktoren verzeichnet (Zhou & Elledge, 1993; Rep *et al.*, 1999; Amoros & Estruch, 2001).

Trotz ihrer essentiellen Rolle in diversen zellulären Prozessen sind die Gene der Hefe-MAPK nicht essentiell, so dass Auswirkungen von Deletionen dieser Gene im MBA-Diffusionstest untersucht werden konnten. Während für Mutanten des *CWI-Pathways* keine atypische Sensitivität gegen das Killertoxin K1 gezeigt werden konnte, verhielten sich Hefen mit Deletionen im *HOG-Pathway* deutlich hypersensitiv. Diese Beobachtungen bestätigen die Daten eines Genom-weiten Screenings, welches die K1-Sensitivität unterschiedlicher Deletionsmutanten untersuchte (Pagé *et al.*, 2003). Dies zeigt nicht nur die Bedeutung des *HOG-Pathways* in der zellulären Adaptation nach K1-Applikation auf, sondern unterstützt gleichzeitig die Hypothese von unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der ionophoren Killertoxine K1 und K2. Ein Screening von Mutanten zeigte nach Inkubation mit K2-Toxin eine signifikante Hypersensitivität von Deletionsmutanten des *CWI-Pathways* auf, so dass dieser MAPK-Signalkaskade im Vergleich eine wesentlichere Rolle in der K2-Biologie zugeschrieben werden kann (Serviene *et al.*, 2012). Allerdings bedarf sowohl die Aktivierung beider Kinasen als auch der involvierten regulierenden Komponenten weiterer Experimente, die ihre genaue Beteiligung an der zellulären Anpassung infolge des toxischen Effekts von K1 aufklären; hierbei könnte auch die Regulation unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren weitergehend untersucht werden. Basierend auf den Daten der Transkriptomanalyse konnten mit Hilfe einer zusätzlichen Datenanalyse unter Zuhilfenahme des DREM-Programmes diverse Transkriptionsregulatoren identifiziert werden, die eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Regulation nach K1-Applikation spielen könnten; eine signifikante De-Regulation konnte bei insgesamt sieben dieser Gene detektiert werden. Neben den bereits erwähnten Proteinen Msn4p und Swi4p waren die Gene der Transkriptionsfaktoren Ace2p, Skn7p, Swi5p und Bas1p signifikant de-reguliert. Der Transkriptionsfaktor Bas1p kontrolliert die transkriptionelle Regulation von Prozessen der Purinbiosynthese und ist

involviert in den THF-*Pathway* (Denis & Daignan-Fornier, 1998). Im Gegensatz dazu ist Skn7p essentiell für die Osmoregulation und die Induktion von *Heat Shock*-Proteinen. Ace2p und sein Paralog Swi5p hingegen sind in die Regulation von Zellzyklusgenen, der Zellmorphogenese sowie des *Mating Type Switch* involviert, so dass die negative Regulation nach K1-Applikation den Anstieg an DNA-Stress unterstreichen und einen Stopp der Zellteilung implizieren könnte (Sbia *et al.*, 2008). *CIN5* hingegen codiert für einen Transkriptionsfaktor der Yap1p-Familie und ist Teil der zellulären Stressantwort und der Vermittlung der pleiotropen *Drug Resistance* (Mendizabal *et al.*, 1998; Furuchi *et al.*, 2001). Der Transkriptionsaktivator Hap4p ist Bestandteil des Hap2/3/4/5p CCAAT-bindenden Komplexes, welcher eine wichtige Rolle im diauxischen *Shift* inne hat; da allerdings keine anderen TF dieses Komplexes signifikant de-reguliert vorlagen, wurde eher eine regulatorische Feinabstimmung vermutet (Forsburg & Guarente, 1989; Zampar *et al.*, 2013). Hap4p spielt außerdem eine Rolle in der mitochondrialen Biogenese, der Respiration und der Osmotoleranz, so dass durch eine positive Regulation dieses TF eine generell höhere Stressresistenz, ein erhöhter zellulärer Metabolismus sowie eine verlängerte Lebensspanne der Zelle erreicht werden könnten (Lascaris *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2018). Tec1p hingegen ist involviert in die Expression von Ty-Retrotransposons, von denen insgesamt fünf (Ty1-5) in der Hefe beschrieben sind; diese parasitären Elemente sind im Wirtsgenom integriert und können durch Umwelteinflüsse auf transkriptioneller Ebene reguliert werden (Kim *et al.*, 1998; Lesage & Todeschini, 2005; Beauregard *et al.*, 2008). Eine solche De-Regulation wurde für 24 retrotransposable Elemente nach Zugabe des Killertoxins beobachtet und stellt eine neue und interessante Grundlage für weitergehende Untersuchungen dar, da die Retrotransposons den höchsten *Fold Change* nach Applikation des Killertoxins zeigten und bislang unbekannt ist, ob bzw. inwiefern sich eine positive oder negative Regulation im Hinblick auf eine K1-Intoxifikation auswirkt.

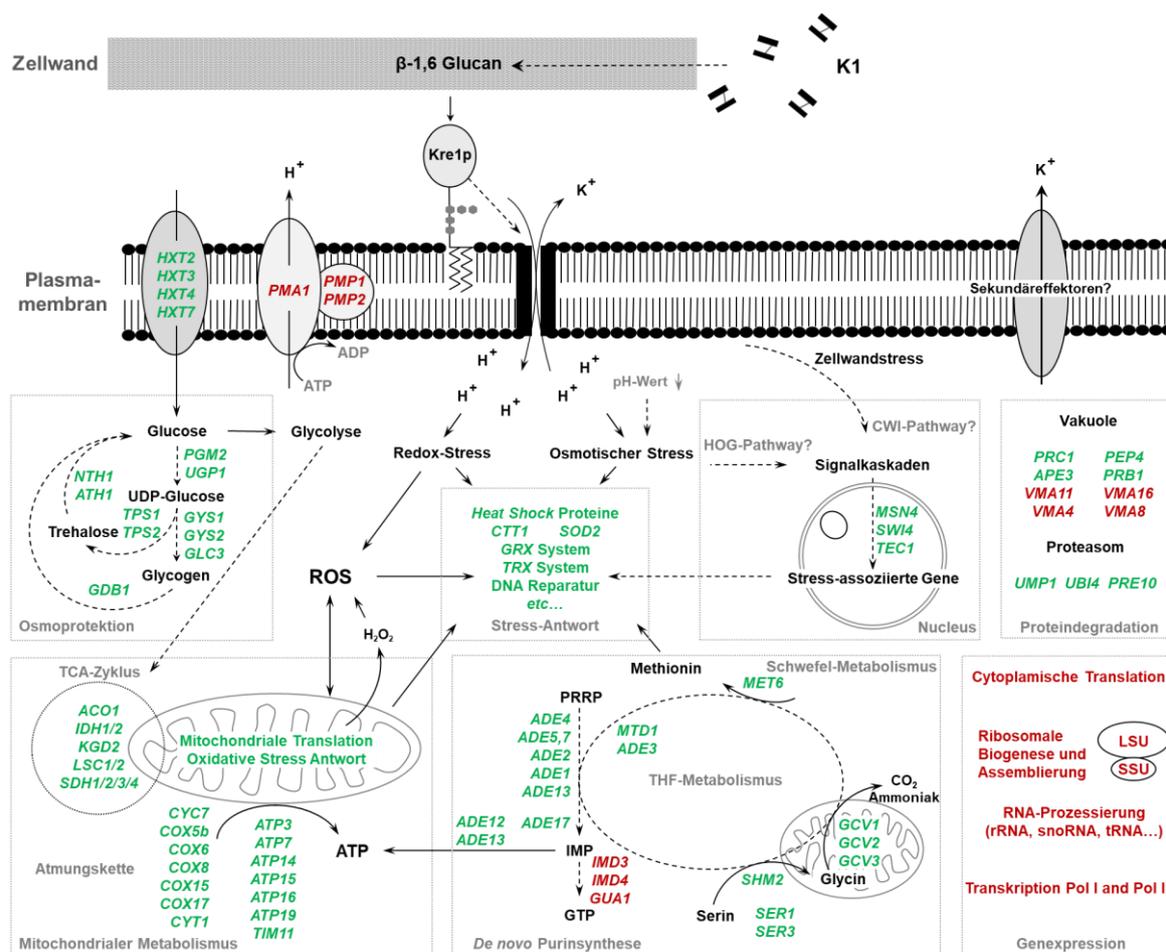


Abbildung 53: Schematische Darstellung der signifikantesten Transkriptom-Adaptationen einer sensitiven Zelle nach Applikation des K1-Toxins. Nach Bindung der Toxinmoleküle an die β -1,6-Glucanfraktion der Zielzelle wird K1 zur Plasmamembran transportiert, wo es mit seinem Sekundärrezeptor Kre1p interagiert. Anschließend erfolgt eine Insertion der toxischen α -Untereinheit in die Plasmamembran, was zur Bildung von Kationen-selektiven Poren und dadurch zu einem Protoneninflux gekoppelt mit einem Kaliumefflux führt. Nach heutigem Stand der Forschung kann eine Beteiligung von Sekundäreffektoren nicht vollständig ausgeschlossen werden (Breinig *et al.*, 2002). Die unkontrollierte Ansammlung von Protonen im Cytoplasma führt neben einem Absinken des pH-Wertes auch zu einer Induktion von osmotischem und oxidativem Stress, was in einer starken positiven Regulierung unterschiedlicher Stress-abhängiger Gene kumuliert. Weiterhin führen osmotischer Stress sowie Störungen der Zellwandintegrität zu einer Aktivierung des HOG- und CWI-Pathways, was die Genexpression weiter an eine zelluläre Stressprotektion adaptiert. Neben der ROS-Detoxifikation, konnte auch eine positive Regulation von *Heat Shock*-Proteinen, DNA-Reparaturmechanismen und den Osmolyten Trehalose und Glycogen detektiert werden. Zusätzlich wurde eine deutliche Anreicherung von Genen des TCA-Zyklus, der *de novo* Purinsynthese sowie des THF-Metabolismus nachgewiesen. Zusammen mit der deutlichen Herunterregulation von Genen der generellen Genexpression (Transkription und Translation) sowie ATP-verbrauchenden Proteinen (*PMA1*, *VMA4*, *VMA8*, *VMA11*, *VMA16*), scheint eine Applikation des K1-Toxins den zellulären Metabolismus hin zu einer erhöhten ATP-Produktion sowie -Generierung zu verschieben. Grün: Hochregulierte Gene; Rot: Herunterregulierte Gene (verändert nach Gier *et al.*, 2019a).

Direkt im Anschluss an die Zugabe des Killertoxins wurde eine signifikante positive Regulation von diversen Genen des Kohlenhydratmetabolismus detektiert (Abb. 53), die über den kompletten Versuchszeitraum bestehen blieb. Sobald bevorzugte Zucker als Energiequelle nicht mehr vorhanden sind, müssen Zellen ihren Metabolismus an die neuen

extrazellulären Begebenheiten anpassen. Obwohl Stress infolge von Nährstoffdepletion sehr unterschiedlich definiert ist, konnte in einer Studie zur Glucose-abhängigen Adaptation des intrazellulären pH-Wertes gezeigt werden, dass deutliche Effekte erst bei Glucose-Konzentration unter 11 mM auftreten (Isom *et al.*, 2018). Zur Reduktion potentieller Artefakte wurde bei der experimentellen Durchführung der RNA-Isolation in dieser Arbeit daher darauf geachtet, dass die Glucose-Konzentration des Mediums auch nach Toxin-Zugabe mit 37 mM deutlich über diesem beschriebenen kritischen Wert verblieb. Die beobachtete Hochregulierung der Glucose-Transporter mit Ausnahme des *Low Affinity*-Transporters Hxt1p ist deshalb nicht auf eine Glucosedepletion zurückzuführen, sondern stellt höchst wahrscheinlich eine Reaktion auf einen Anstieg an osmotischen Stress innerhalb der Zelle dar, wie es für diverse Gene des Kohlenhydratstoffwechsels gezeigt werden konnte (Gasch *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000). Zusätzlich könnte es aufgrund der ionophoren Wirkung des K1-Toxins zu Störungen des Glucose-Transports über die Plasmamembran bzw. zu generellen Fehlfunktionen der jeweiligen Transporter kommen.

Zudem ist der Flux der Glycolyse äußerst komplex und mit mehreren Feedback-Mechanismen stark reguliert, damit eine schnelle Anpassung an die zellulären Bedürfnisse in Abhängigkeit der extrazellulären Bedingungen gewährleistet werden kann. Zur Analyse, ob Glucose-Transporter bzw. *Glucose-sensing* Gene tatsächlich einen Einfluss auf die K1-Sensitivität haben, wurden ausgewählte Deletionsmutanten im MBA-Diffusionstest untersucht. Hierbei konnte zwar eine deutliche Hypersensitivität für die Deletionsmutanten *Δhxt1*, *Δhxt2*, *Δhxt4* und *Δpde2* beobachtet werden, allerdings unterschieden sich die meisten Gene dieser Gruppe nicht signifikant vom Wildtyp hinsichtlich ihrer Sensitivität gegen das Killertoxin; insbesondere der Phänotyp der *Δpde2*-Mutante kann durch einen Abfall des cytosolischen pH erklärt werden, welcher so die K1-Toxizität signifikant verstärken könnte (Isom, *et al.*, 2018). Zusätzlich waren Gene der vakuolären Degradationsmaschinerie (*PRC1*, *PEP4*, *PRB1*, *APE3*) und des Proteasoms positiv reguliert, was auf einen Zustand von erhöhter Proteindegradation hindeutet, der möglicherweise der Zelle mehr Nährstoffressourcen während Stresssituationen zur Verfügung zu stellen könnte.

Obwohl nach K1-Applikation nur wenige Gene von Proteinen der Glycolyse signifikant dereguliert vorlagen, wurde eine positive Regulation von nahezu allen Genen beobachtet, die für Proteine des TCA-Zyklus codieren, sowie der Cytochromisofom Cyc7p und der Gene *COX15* und *COQ5*, die beide für die Biosynthese und Assemblierung der Cytochrom c-

Oxidase notwendig sind. Zusammengenommen könnte dies auf einen Anstieg der respiratorischen Kapazität der Zelle und folglich auf eine verstärkte Bildung von ATP hindeuten. Eine solche Erhöhung hätte gleichzeitig eine Zunahme an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *Reactive Oxygen Species*) zur Folge und könnte aus diesem Grund ebenfalls zur Hochregulation von Genen der oxidativen Stressantwort sowohl in den Mitochondrien als auch im Cytosol beitragen. Eine Dysfunktion der Mitochondrien, insbesondere eine inkorrekte Assemblierung der unterschiedlichen Komplexe der Atmungskette, kann unterschiedliche Signalkaskaden induzieren, die zu einer Veränderung des zellulären Metabolismus führen. Obwohl der vollständige Mechanismus der Signaltransduktion noch unklar ist, kann die Ausschüttung von mitochondrialen Peptiden ins Cytoplasma eine negative Regulation der cytoplasmatischen Translation bei gleichzeitiger Hochregulation der mitochondrialen Translation initiieren (Arnold *et al.*, 2006; Suhm & Ott, 2017). Dies würde die Beobachtung erklären, dass eine deutliche Hochregulation von Genen der mitochondrialen Ribosomen nach K1-Applikation beobachtet wurde; eine Inkubation mit dem ebenfalls ionophor wirkenden Toxin PMKT aus *Pichia membranifaciens* führte hingegen zu einer moderaten negativen Regulation von Genen dieser Kategorie (Santos *et al.*, 2005). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Störungen des mitochondrialen Proteinimports zu einer Akkumulation von Precursorproteinen führen können, so dass ein Zustand der generellen Proteostasis zur Regulation der Proteinhomöostase induziert wird (Wrobel *et al.*, 2015).

Unmittelbar nach Applikation des Killertoxins K1 konnte die positive Regulation einer hohen Anzahl von Stressgenen beobachtet werden, die vor allem mit Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress verbunden sind, wie beispielsweise *TSA1* und *SOD2*. Diese Beobachtung wurde durch die positive transkriptionelle Regulation von *GRX1*, *GRX2*, *GTT1*, *HYR1* (*GPX3*), *PRX1*, *TRX1* und *CTT1* weiter bestätigt, was auf einen kontinuierlichen Anstieg an oxidativem Stress hindeutet (**Abb. 53**). Erhöhte Mengen an ROS greifen zelluläre Strukturen wie Proteine, Lipide und DNA an und führen zu einer Dysbalance der reduktiven Kapazität des Cytoplasmas der Zelle. Aus diesem Grund besitzen Hefen hoch konservierte Detoxifikationssysteme um toxische Mengen von ROS zu beseitigen. Hierzu gehören beispielsweise Katalasen, Superoxid-Dismutasen und Peroxidasen. Die Hauptperoxidasen der Hefe sind Glutathion- (GPX) und Thioredoxin- (TRX)-Peroxidasen, die eine essentielle Rolle in zellulären Abwehrmechanismen gegen oxidative Agentien spielen. Für *S. cerevisiae* sind drei GPX-Gene beschrieben, wobei *HYR1*

(*GPX3*) sowohl den TF Yap1, einen der Hauptregulatoren der oxidativen Stressgene, aktiviert sowie die höchste Enzymaktivität zeigt (Inoue *et al.*, 1999; Avery & Avery, 2001; Grant, 2001; Delaunay *et al.*, 2002). Die cytoplasmatische TRX-Peroxidase Tsa1p schützt Thiol-haltige Oxidationssysteme und entfernt Hydrogenperoxid und Alkylhydroperoxid im Zusammenspiel mit dem Thioredoxinsystem der Zelle. Weitere Untersuchungen konnten zudem eine Chaperon-ähnliche Funktion des Proteins demonstrieren, die es neben seiner Peroxidaseaktivität ausübt und die eine wichtige Rolle im Schutz gegen reduktiven Stress durch das Verhindern von Proteinaggregaten übernimmt (Park *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2004; Trotter & Grant, 2002; Rand & Grant, 2006). Neben der aktiven Entsorgung von ROS sind auch Mechanismen notwendig, die in der Lage sind, bereits geschädigte Strukturen zu reparieren; hierzu werden vor allem Glutaredoxin- und Thioredoxin-haltige Systeme verwendet. Das Cytosol der Hefe besitzt zwei Glutathion-abhängige Glutaredoxine, die durch die Gene *GRX1* und *GRX2* codiert werden, sowie die Thioredoxine Trx1p und Trx2p. Zusammengefasst konnte eine sehr deutliche positive Regulation unterschiedlicher Mechanismen zur Abwehr von oxidativem Stress sowohl im Cytosol, als auch in den Mitochondrien als Reaktion auf die Toxinapplikation gezeigt werden. Die sukzessive Zunahme an positiv regulierten Genen dieser zellulären Stressantwort impliziert einen kontinuierlichen Anstieg an oxidativem Stress. Zudem wurde eine positive Regulation der Gene *XPB1*, *MSH1*, *MSH2*, und *DDR2* beobachtet, die zusätzlich auf ein verstärktes Aufkommen von zellulären DNA-Schäden hindeutet.

Neben der positiven Regulation von Proteinen, die wesentliche Bestandteile der oxidativen Stressabwehr darstellen, wurde auch eine signifikante Anreicherung von Genen des Trehalose und Glycogenmetabolismus nach K1-Intoxifikation detektiert. Osmolyte wie Trehalose, Glycogen und Glycerol besitzen Eigenschaften zur Detoxifikation sowie zur Stabilisierung von zellulären Proteinen und sind daher essentiell in unterschiedlichen Zellstresssituationen (Yancey, 2005). Bereits zehn Minuten nach Applikation des Killertoxins war die Mehrheit der Gene, die an der Biosynthese dieser Osmolyte beteiligt sind, signifikant hochreguliert, wobei diese positive Regulation über den gesamten Versuchszeitraum bestehen blieb (**Abb. 53**). Neben ihrer Eignung als sekundäre Energiequelle dienen sie aufgrund ihrer osmoprotektiven Eigenschaften zur Stabilisierung von fehlgefalteten Proteinen sowie zum Schutz vor starkem zellulären Wasserverlust durch Veränderungen des osmotischen Drucks. Zudem besitzen diese Osmolyte eine wichtige Rolle in der Detoxifikation von ROS sowie der Reduktion der Lipidperoxidation (Allison *et*

al., 1999; Benaroudj *et al.*, 2001; Pereira Ede *et al.*, 2003; Kandror *et al.*, 2004; da Costa Morato Nery *et al.*, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Trehalose in der Lage ist, Membranstrukturen durch den Transport in den Extrazellularraum zu stabilisieren (da Costa Morato Nery *et al.*, 2008). Zusätzlich zu den Genen der Trehalose- und Glycogenbiosynthese, die direkt zu frühen Zeitpunkten der K1-Toxinapplikation positiv reguliert wurden, konnte eine Hochregulation von *NTH1*, *NTH2* und *ATH1* sowie *GPH1* und *GDB1* zu späteren Zeitpunkten detektiert werden, deren Genprodukte jeweils für die Degradation von Trehalose und Glycogen zuständig sind. Dieser Zyklus von Auf- und Abbau von Osmolyten, der bereits für verschiedene Stresssituationen beschrieben wurde, verbraucht eine erhebliche Menge an Energie (Parrou *et al.*, 1997; Parrou *et al.*, 1999).

Ein weiteres wichtiges Osmolyt in Hefen ist Glycerol, das als einfach strukturiertes Polyol sehr schnell unter zellulären Stresssituationen akkumuliert (Klipp *et al.*, 2005). Produziert wird es durch Reduktion von Dihydroxyaceton-Phosphat zu Glycerol-3-Phosphat, welches anschließend dephosphoryliert wird. Während der erste Schritt durch eine NAD-abhängige Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenasen Gpd1p und Gpd2p katalysiert wird, ist die Dephosphorylierung von den DL-Glycerol-3-Phosphat-Phosphatasen Gpp1p und Gpp2p abhängig. Direkt nach K1-Applikation wurde eine signifikante Reduktion der mRNA-Menge der Gene *GPD1* und *GPP1*, gefolgt von *GPD2* und *GPP2* zu intermediären Zeitpunkten, detektiert. Diese Beobachtung steht im direkten Gegensatz zu einer vergleichbaren Transkriptomanalyse, welche die toxischen Effekte des Killertoxins PMKT charakterisierte und eine distinkte positive Regulation der Gene *GPD1* und *GPP2* verzeichnen konnte (Santos *et al.*, 2005). Eine mögliche Erklärung könnte in den gewählten experimentellen Bedingungen liegen, da der in dieser Analyse verwendete Hefestamm durch längere Kultivierung in Glycerol-haltigem JG-Medium metabolisch an die Versuchsbedingungen angepasst wurde. Die negative Regulierung der Glycerol-abhängigen Gene könnte auch darauf hindeuten, dass Glycerol-Moleküle nach K1-Zugabe in der Lage sind, die Plasmamembranbarriere zu überwinden und so einen negativen Feedback-Loop der Regulation dieser Gene zu induzieren. Obwohl das Killertoxin Kationen-selektive Kanäle in artifiziellen Lipidmembranen ausbildet, kann eine passive Diffusion von ungeladenen kleinen Molekülen nicht vollständig ausgeschlossen werden (Martinac *et al.*, 1990). Alternativ könnte der Glycerolinflux auch in einer Störung des Glyceroltransporters Fsp1p begründet sein. Ein Anstieg der intrazellulären Glycerolkonzentration würde hierbei die negative Regulation von Glycerolsynthese-abhängigen Genen sowie die Hochregulation von Genen, die für Glycerol-verbrauchende Proteine wie beispielsweise Gut2p codieren,

erklären. Die Bestimmung der intra- und extrazellulären Glycerolkonzentration nach Toxinzugabe ergab keine signifikanten Schwankungen über die Zeit, wobei zusätzlich auch kein Unterschied zwischen Applikation von aktivem und inaktiviertem Toxin beobachtet werden konnte. Dies widerspricht zwar einer potentiellen Akkumulation des Osmolyts über die Zeit, könnte allerdings auch auf einen Flux von Glycerol über die poröse Membran bzw. den Transporter Fps1p hindeuten. Zusätzlich war eine Bestimmung des extrazellulären Glycerolgehalts durch die bereits vorhandene freie Glycerolmenge des verwendeten Mediums nicht durchführbar, so dass die Akkumulation bzw. der Export von Glycerolmolekülen in Abhängigkeit des K1-Toxins erneut in Glycerol-freiem Medium analysiert werden sollten, um potentielle Artefakte ausschließen zu können. Allerdings konnte mit Hilfe eines Genom-weiten Screenings von *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten bereits eine wildtypische Reaktion auf extrazelluläre Applikation von K1 in einer *Δgpd1-gpd2* Doppelmutante gezeigt werden, so dass Glycerol als Osmolyt wohl keine kritische Rolle in der K1-Biologie spielt (Pagé *et al.*, 2003).

Weiterhin zeigten die Daten der Transkriptomanalyse die positive Regulation vieler Gene der *de novo* Purinbiosynthese und des Tetrahydrofolat (THF)-Metabolismus. Nach der Bildung unterschiedlicher Zwischenstufen wird Inosinmonophosphat (IMP) durch die Aktivität der Genprodukte von *ADE16* und *ADE17* gebildet (Tibbetts & Appling, 2000). IMP fungiert als Precursor für GTP über die Aktivität von Imd3p, Imd4p und Gua1p oder aber für ATP. Interessanterweise konnte eine positive Regulation von diversen *ADE*-Genen beobachtet werden, wohingegen die Gene zur Bildung von GTP signifikant herunterreguliert waren, so dass ein *Shift* zu einer erhöhten ATP-Synthese stattfinden könnte. In diesem Zusammenhang waren zudem Gene, die für das THF-Cycling verantwortlich sind, signifikant hochreguliert, welche im GO-Term *One Carbon Metabolism* zusammengefasst werden können (**Abb. 53**). Hierzu zählen die Produkte der Gene *SER1* und *SER3*, die in den Serin-Metabolismus involviert sind, *SHM2*, welches die Konversion von Serin zu Glycin vermittelt, sowie *GCVI-3*, welche die darauffolgende Glycindergradation katalysieren; diese Gene spielen eine essentielle Rolle im THF-Metabolismus und Verbrauch von THF-Derivaten (Piper *et al.*, 2000). Zudem wurde bereits nach zehnmütiger Inkubation mit K1-Toxin eine signifikante Herunterregulation von unterschiedlichen Genen ATP-konsumierender bzw. -bindender Proteine (u. a. *PDR5* und *PDR12*) beobachtet, was auf eine Reduktion des zellulären ATP-Verbrauchs hindeuten könnte. Zu späteren Zeitpunkten konnte diese De-Regulation nicht mehr detektiert werden,

was wahrscheinlich auf dem gestiegenen Bedarf an *Heat Shock*-Proteinen begründet ist und zudem mit der positiven Regulation von diversen Genen dieser Proteinfamilie zu späteren Zeitpunkten der K1-Intoxifikation korreliert (z. B. *HSP12*, *HSP26* und *HSP42*). Interessanterweise wurde eine dauerhafte negative Regulation von *PMA1* und den Pma1p-Regulatoren *PMP1* und *PMP2* beobachtet, welche möglicherweise einen sekundären Effekt der Toxinwirkung darstellt und auf dem stetig sinkenden intrazellulären pH-Wert basiert. Als Hauptprotonenpumpe der Cytoplasmamembran stellt Pma1p einen der größten ATP-Konsumenten dar und ist essentiell für die Regulation des cytosolischen pH-Wertes und des elektrochemischen Protonengradienten (Serrano *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1992; Morsomme *et al.*, 2000). Zusätzlich zu einer deutlich verringerten Aktivität der Plasmamembran-ATPase in *pmp1-pmp2* Mutanten, konnte eine Internalisierung von Pma1p als Konsequenz einer Deletion oder Inhibierung der vakuolären ATPase (V-ATPase) gezeigt werden (Navarre *et al.*, 1994; Martinez-Munoz & Kane, 2008). Diese Protonenpumpe ist aus diversen Untereinheiten aufgebaut und verantwortlich für die Azidifizierung der Vakuole und lysosomaler bzw. endosomaler Kompartimente. Die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse zeigten eine negative Regulation von Genen der V_0 -Domäne (*VMA11* und *VMA16*) sowie der V_1 -Domäne (*VMA4* und *VMA8*). In einem Screening diverser Deletionsmutanten mit Mutationen der V-ATPase sowie *PMA1* und dessen Homolog *PMA2* konnte ebenfalls ein distinkt hypersensitiver Phänotyp beobachtet werden, der vergleichbar mit Mutanten des *HOG-Pathways* ist. Das Phänomen könnte auf einer Störung der pH-Homöostase beruhen, die in einer Akkumulation von Protonen im Cytoplasma kumuliert, wobei diese Azidifizierung und ein Defekt im vakuolären Transport den toxischen Effekt von K1 deutlich verstärken würden. Aus diesem Grund wäre nicht nur eine Bestimmung der Proteinlevel beider ATPasen bzw. diverser Untereinheiten nach Toxinzugabe, sondern auch eine Messung der verbleibenden Aktivität von Pma1p interessant, um hierdurch neue Hinweise auf die Wirkung des K1-Toxins zu gewinnen.

Insgesamt scheinen die Adaptationen des Transkriptoms eines sensitiven Hefestammes nach Applikation des Killertoxin K1 auf einen Anstieg von intrazellulär verfügbarem ATP hinzudeuten. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Bestimmung des extra- und intrazellulären ATP-Gehaltes reproduzierte den K1-induzierten Verlust des Metabolits durch die Disruption der Plasmamembran, der bereits in früheren Studien beobachtet werden konnte (Bussey & Sherman, 1973). Allerdings blieben trotz dieses Verlusts die intrazellulären Konzentrationen bis ungefähr 120 Minuten nach Toxinzugabe relativ

konstant. Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse der Transkriptomanalyse, die einen metabolischen *Shift* zu einer höheren ATP-Produktion impliziert. In diesem Zusammenhang könnte der erhöhte ATP-Bedarf der Zelle auf einen Reparaturmechanismus zurückgehen, welcher bereits für Säugerzellen beschrieben wurde; so waren diese Zellen nach Intoxikation mit Aerolysin bzw. Listeriolysin O in der Lage, eine ATP-abhängige Reparatur der Plasmamembran durchzuführen, wodurch das Ionengleichgewicht wiederhergestellt werden konnte. Dieser Mechanismus korreliert hierbei mit dem Durchmesser, der Stabilität und der Häufigkeit der Poren (Gonzalez *et al.*, 2011). Diese Hypothese wird durch die in dieser Arbeit beobachtete Verzögerung zwischen Toxinapplikation, der Bildung von PI-detektierbaren Poren und dem tatsächlichen Eintritt des Zelltods unterstützt. Trotzdem zeigt der Verlust von ATP und diversen Metaboliten, dass es sensitiven Zellen nicht möglich ist, die durch K1 gebildeten Poren abzubauen, so dass sie mit anhaltender K1-Intoxikation an der Reparatur geschädigter Membranstellen scheitern und absterben (Bussey & Sherman, 1973). Alternativ könnte der metabolische *Shift* hin zu einer erhöhten ATP-Produktion auch die hydrotropische Funktion des Metabolits reflektieren, die eine höhere Proteinlöslichkeit unabhängig von Chaperonen gewährleisten kann (Patel *et al.*, 2017).

Das Killertoxin K1 tötet sensitive Zellen durch eine Disruption der Plasmamembranintegrität, so dass ein energetischer und elektrochemischer Zusammenbruch des Membranpotentials in einer sensitiven Zelle initiiert wird. Verschiedene Studien konnten bereits eine *Lag*-Phase beobachten, die der eigentlichen letalen Wirkung des Killertoxins vorangeschaltet ist und die in dieser Arbeit erstmals qualitativ mit der Lebendzellzahl korreliert wurde. Diese Zeitspanne zwischen ersten PI-detektierbaren Poren und der eigentlichen Applikation des Toxins ist kein Alleinstellungsmerkmal des K1-Killertoxins, sondern konnte auch für das *Pichia*-Toxin PMKT gezeigt werden, welches K1 in manchen Charakteristika ähnelt (Santos *et al.*, 2005). Diese besondere Ähnlichkeit könnte auf einen generellen Mechanismus der Toxizität bestimmter Hefe-basierter ionophorer Killertoxine hindeuten, so dass eine analoge Untersuchung mit dem Killertoxin K2 interessante neue Daten generieren könnte. Abgesehen von der schnellen Bindung des K1-Toxins an die Glucanfraktion der Zellwand und dem schnellen Transfer zur Plasmamembran, könnte die *Lag*-Phase unterschiedliche Ereignisse der Porenbildung wie beispielsweise eine Oligomerisierung der toxischen Untereinheiten umfassen (Skipper & Bussey, 1977; Bussey, 1991; Kurzweilova & Sigler, 1995). Mit der durchgeführten Transkriptomanalyse konnten somit neue Einsichten in potentielle metabolische Adaptationen gewonnen werden, die

deutlich über bisher bekannte Effekte des ionophoren Toxins hinausgehen und neue grundlegende Interpretationen der *Lag*-Phase als einen initialen Abwehrmechanismus einer sensitiven Zelle zulassen (Gier *et al.*, 2019a).

Intrinsischer Selektionsdruck in Abhängigkeit der Toxinsekretion

Aufgrund ihrer sehr kurzen Generationsdauer und den resultierenden evolutionären Vorteilen sind Viren in der gesamten Flora und Fauna weitverbreitet. Anders als lytisch-agierende Viren, welche die Wirtszelle klassisch parasitieren und zur eigenen Vermehrung abtöten, bilden Mykoviren eine stabile Symbiose mit der jeweiligen Wirtszelle aus; zudem konnte für letztere bisher kein extrazelluläres Stadium nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist die Reproduktionseffizienz dieser Viren sehr stark an den Metabolismus und die Fitness ihrer Wirtszelle gekoppelt, so dass die meisten Infektionen mit Mykoviren mit asymptomatischen Phänotypen einhergehen oder sogar leichte Wachstumsvorteile für die Wirtszelle mitbringen (Wickner, 1991; Ahn & Lee, 2001). Einen besonderen Phänotyp, der mit einer mykoviralen Infektion verknüpft ist, stellt das Killerphänomen der Hefe dar. Obwohl die Expression von Killertoxinen mit metabolischen Kosten für die Hefezelle verbunden ist, bringt die Sekretion der toxischen Proteine deutliche Selektionsvorteile gegenüber Nicht-Killerhefen mit sich, da durch Ausschluss von sensitiven Hefen neue biologische Nischen kolonialisieren werden und mehr natürliche Ressourcen zur Verfügung stehen können (Bussey, 1988; Rowley, 2017; Pintar & Starmer, 2003). Weiterhin sind Killerhefen untereinander phylogenetisch deutlich näher miteinander verwandt als Nicht-Killerstämme, was bereits eine enge Co-Adaptation zwischen Wirtshefe und dem entsprechenden Virus impliziert (Pieczynska *et al.*, 2013; 2017).

Das Killerphänomen ermöglicht nicht nur direkte Untersuchungen der Wirt-Virus-Dynamik, sondern kann auch zur Analyse potentieller Co-Adaptationen beider Organismen in einem eukaryontischen Modell genutzt werden. Obwohl Killertoxine von vielen unterschiedlichen Hefegattungen produziert werden und damit eine essentielle Rolle in der biologischen Diversität von Hefekolonien in natürlichen Habitaten innehaben, wurden bis heute wenige Studien durchgeführt, die Einflüsse des Toxins auf die Killertoxin-produzierende Zelle selbst untersuchen. In dieser Arbeit wurde daher ein System aus zwei K1-Killerhefen mit

distinkten Charakteristika verwendet, um potentielle zelluläre Anpassungen der Hefezellen in Abhängigkeit der Toxinsekretion zu untersuchen.

Die Killerhefe KIM01, die durch Transfektion von VLP eines K1-Killerstamms hergestellt wurde und damit sämtliche Eigenschaften eines natürlichen Killers besitzt, sowie ihr Derivat KIM01s wurden auf Transkriptom- und Lipidomebene näher analysiert. Obwohl für beide Stämme virale M_1 -dsRNA im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte, wurde eine deutlich geringere Toxinsekretion für den Stamm KIM01s beobachtet. In Anbetracht der logarithmischen Korrelation von sezernierter Toxinmenge und der Ausbildung eines Hemmhofs, die durch die passive Diffusion des Toxins limitiert ist, bedeutet dies eine signifikant geringere *in vivo* Toxizität. Dies konnte in entsprechenden MBA-Diffusionstests verdeutlicht werden, wobei eine distinkte toxische Wirkung von KIM01s-Hefen lediglich gegen sphäroplastierte Zellen beobachtet werden konnte. Im direkten Vergleich zum Superkillerstamm T158c, der aufgrund von zwei Punktmutationen im Precursor ein deutlich stabileres Toxin sezerniert, war die K1-Sekretion von KIM01 zwar geringer, aber ausreichend, um sowohl intakte als auch sphäroplastierte Zellen abzutöten (Palfree & Bussey, 1979), (**Abb. 54, Toxizität**). Eine Sequenzanalyse der viralen M-dsRNA bzw. des K1-ORF sollte Rückschlüsse auf potentielle Mutationen zulassen, die zu beobachteten geringeren Sekretion bzw. Toxizität des Killertoxins von Hefen des KIM01s-Stammes führen. Allerdings ist eine Sequenzierung von doppelsträngiger RNA mit unterschiedlichen Schwierigkeiten verbunden, da vor allem sehr starke Sekundärstrukturen ausgebildet werden, die eine Denaturierung im Verlauf der reversen Transkription deutlich erschweren. Zwar konnten PCR-Produkte, die spezifisch für das M_1 -Genom bzw. das K1-Volllängentoxin waren, amplifiziert werden, allerdings wurden für alle verwendeten Killerhefen deutliche Nebenprodukte detektiert. Da eine Sequenzierung der entsprechenden reisolierten PCR-Amplifikate mit Hilfe der Sanger-Methode nicht erfolgreich war, stellt die Durchführung einer Illumina-Sequenzierung einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Sequenzanalysen dar. Diese Methode hätte vor allem den Vorteil, dass keine spezifischen Primer verwendet werden müssten und PCR-basierte Fehler somit vermieden werden können.

Interessanterweise konnte für Zellen des Stammes KIM01s eine distinkte Sensitivität gegen extrazellulär appliziertes Toxin des K1-Killerstammes T158c dokumentiert werden. Dieser atypische Verlust der Immunität, die normalerweise durch die Expression des K1-Volllängentoxins sichergestellt wird, deutet auf ein besonders ausbalanciertes System aus Mechanismen und Molekülen hin, welches durch additives Toxin aus dem Gleichgewicht

gebracht wird. Prinzipiell sind KIM01s-Zellen in der Lage, sich vor ihren selbst sezernierten Toxinmengen zu schützen, allerdings wird durch Zugabe von zusätzlichem extrazellulären Toxin der intrinsische Mechanismus der Immunität offenbar erschöpft, so dass die additive Belastung nicht mehr kompensiert werden kann (**Abb. 54, Immunität**). Diese Hypothese konnte durch Kompensationsversuche mit dem wildtypischen K1-Precursor bestätigt werden, der nach Expression eine vollständige Immunität gewährleisten konnte. Dies schließt Funktionseinschränkungen des zellulären Sekretionsweges bzw. von Proteinen, die an der Toxinreifung beteiligt sind, welche auch einen Einfluss auf die Ausbildung der funktionellen Immunität haben könnten, aus.

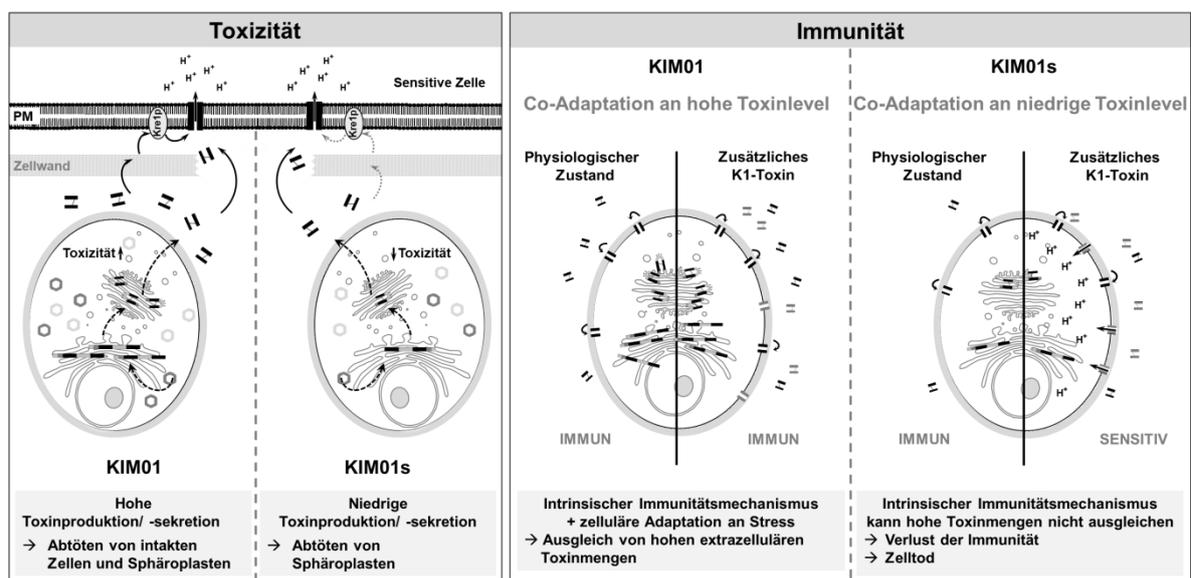


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Adaptation von K1-Killerhefen in Abhängigkeit der Toxinsekretion. Toxizität (links). Nach Sekretion des reifen K1-Heterodimers (grau) bindet dieses in einem zweistufigen Prozess zunächst an die β -1,6-Glucanfraktion der Zellwand, wird zur Plasmamembran transloziert und interagiert anschließend mit seinem Sekundärrezeptor Kre1p. Ein toxischer Effekt konnte für den Killerstamm KIM01 beobachtet werden, während Zellen der Killerhefe KIM01s lediglich in der Lage waren, Sphäroplasten einer sensitiven Hefe abzutöten, bei denen die Bindung an die der Zellwand entfällt und das K1-Toxin direkt an die Plasmamembran gelangen kann. **Immunität (rechts).** Obwohl für beide Stämme M_1 -dsRNA im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte und beide Hefestämme keine Selbstkiller-Eigenschaften zeigen, weisen KIM01s-Zellen einen deutlichen Verlust der intrinsischen Immunität auf sobald additives K1-Toxin extrazellulär zugegeben wird (schwarz). Ein Vergleich des basalen Transkriptomts beider Stämme zeigte eine deutlich höhere Expression von diversen Stress-abhängigen Genen in KIM01. Diese zellulären Mechanismen, die an die höhere Toxinsekretion angepasst sind, reichen aus, dass Zellen dieser Killerhefe auch bei zusätzlicher extrazellulärer Toxin-Belastung immun sind. Im Unterschied hierzu kann KIM01s aufgrund der niedrigen K1-Sekretion bzw. -Produktion den Immunitätsmechanismus nicht aufrechterhalten, sobald eine bestimmte extrazelluläre Toxinmenge überschritten wird (verändert nach Gier *et al.*, 2019c).

Zusätzlich zum exakten molekularen Mechanismus der Immunität ist bis heute auch nicht bekannt, wie die Porenbildung an der Plasmamembran initiiert wird bzw. ob eine Insertion

des K1-Toxins auch in die Membran von K1-Killerzellen stattfinden kann. In dieser Arbeit wurde die Porenbildung in K1-produzierenden Killerhefen mit Hilfe einer quantitativen FACS-Analyse bestätigt. Hierbei zeigten Zellen des Stammes KIM01 den höchsten Prozentsatz an PI-positiven Zellen; die reduzierte Porenbildung in KIM01s beruht wahrscheinlich auf der ebenfalls geringeren Sekretionsrate und der damit verbundenen geringeren extrazellulären Toxinmenge. Der Superkillerstamm T158c hingegen schien am besten an die erneute Bindung bzw. Re-Internalisierung des eigenen sezernierten K1-Toxins adaptiert zu sein, was auf eine Anpassung der molekularen Immunitätsmechanismen an die deutlich höheren Sekretionslevel des Killertoxins hindeutet. Diese Beobachtung der „unvollständigen“ Immunität deckt sich mit einem vergleichbaren Phänotyp, welcher nach intrazellulärer Expression des K1-Volllängentoxins über ein centromeres Plasmid auftritt (Valis *et al.*, 2006). Allerdings konnte in einer korrelativen Analyse der Porenbildung und der Lebendzellzahl in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Detektion von PI-positiven Zellen nicht direkt mit dem Tod der entsprechenden Zelle gleichzusetzen ist (Gier *et al.*, 2019a). Basierend auf der Beobachtung der unvollständigen Immunität von KIM01s und im Hinblick auf mögliche zelluläre Anpassungen wurde eine Transkriptomanalyse beider K1-Killer durchgeführt. Die Auswertung der Daten zeigte im Unterschied zur analog durchgeführten Analyse des sensitiven Stammes BY4742 eine relativ geringe Anzahl differentiell exprimierter Gene in Antwort auf die extrazelluläre Applikation des K1-Killertoxins. Diese moderate transkriptionelle Reaktion auf additives K1-Toxin im Vergleich zu BY4742 beruht vermutlich darauf, dass beide Stämme K1-Killer und somit ständig ihrem eigenen Toxin ausgesetzt sind. Ähnlich zum sensitiven Stamm wurden in beiden Killerhefen auch viele Gene des Kohlenstoffmetabolismus sowie der generellen Stressantwort positiv reguliert. Außerdem wurde eine Hochregulation der Transkriptionsfaktoren *TEC1*, *HAP4*, *MSN4* und *CIN5* beobachtet, die ebenfalls in der K1-sensitiven Hefe BY4742 de-reguliert wurden und auf eine allgemeine Stressantwort hindeuten.

Während für eine zeitabhängige Interpretation der Daten die DEG beider ausgewählten Zeitpunkte auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle jedes Stammes bezogen wurden, konnten mit Hilfe eines paarweisen Vergleichs die Zustände beider Stämme sowohl vor Toxinzugabe als auch unter Einfluss des Killertoxins miteinander verglichen werden. Bereits für die basale Expression, d. h. vor der eigentlichen Toxinzugabe, wurden signifikante Unterschiede in beiden Stämmen detektiert. So waren Gene, die wichtig für die Regulation des Energie- und IMP-Metabolismus sowie für die Zelladhäsion und die DNA-

Integration sind, im Killerstamm KIM01 signifikant höher exprimiert. Insgesamt schien das Transkriptom dieses K1-Killers deutlich stärker an höhere Stresssituationen angepasst zu sein. Wurden die Transkriptome beider Stämme nach Toxinzugabe miteinander verglichen, so zeigten in KIM01 besonders Gene des THF-Metabolismus eine positive Regulation, obwohl diese bereits basal stärker exprimiert wurden. Ähnlich zu BY4742 könnte dies auf einen *Shift* zu einer höheren ATP-Produktion hindeuten, da auch Gene wie *SER1*, *SHM2*, *GCV1*, *GCV2*, und *GCV3*, die eine essentielle Rolle im THF-Metabolismus und -Derivat-Recycling spielen, ähnlich hochreguliert wurden (Piper *et al.*, 2000). In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass sensitive Zellen auch nach Disruption der Plasmamembran und Verlust von ATP die intrazelluläre Konzentration dieses Metabolits einige Zeit konstant halten können. Der Energieträger ATP ist hierbei nicht nur eine wesentliche Energiequelle, die verwendet werden kann, um Membranschäden zu reparieren, sondern könnte auch aufgrund seiner hydrotropischen Funktion die Stabilität und Löslichkeit von Proteinen unabhängig von Chaperonen gewährleisten (Patel *et al.*, 2017). Wurden Zellen des Killerstammes KIM01s, die sensitiv auf K1-Toxinzugabe reagierten, mit höheren Toxin-Konzentrationen behandelt konnte keine weitere Hochregulation dieser Gene im Vergleich zu KIM01 detektiert werden.

Zusätzlich wurden in der Killerhefe KIM01 im Vergleich zu KIM01s nach Inkubation mit K1 Gene des Trehalose- und Glycogenmetabolismus, wie beispielsweise *TSL1*, *TPS1*, *TPS2*, *GSY1*, signifikant höher exprimiert. Wie bereits zuvor erläutert sind diese Osmolyte essentiell für diverse zelluläre Abwehrmechanismen und es konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression dieser Gene Stress-kontrolliert ist (Winderickx *et al.*, 1996; Parrou *et al.*, 1997; Parrou *et al.*, 1999). Neben der Funktion als generelle osmoprotektive Substanz und alternative Energiequelle ist Trehalose zudem an der ROS-Detoxifikation und der Verringerung der Lipidperoxidation sowie der Membranstabilisation beteiligt (Allison *et al.*, 1999; Benaroudj *et al.*, 2001; Pereira Ede *et al.*, 2003; Kandror *et al.*, 2004; da Costa Morato Nery *et al.*, 2008).

Basierend auf den deutlichen Adaptationen des Transkriptoms im Hinblick auf K1-Zugabe wurde weiterhin die zelluläre Membranzusammensetzung beider K1-Killer KIM01 und KIM01s verglichen. Obwohl die Lipidkomposition von Hefemembranen im Vergleich zu höheren Eukaryonten deutlich einfacher gestaltet ist, besitzt sie eine hohe Flexibilität, die eine schnelle Anpassung an Veränderungen der extrazellulären Umgebung erlaubt (Klose, Surma *et al.*, 2012). Die häufigsten Lipidspezies in Hefemembranen sind die Phospholipide Phosphatidsäure (PA), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE),

Phosphatidylinositol (PIN), Phosphatidylserin (PS) und Diacylglycerol (DAG). Weiterhin hat Ergosterol den höchsten Anteil in der Plasmamembran, während Triacylglyceride als Speicherlipide verwendet werden. Generell ist die Plasmamembran von Hefen aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse von anionischen und neutralen Lipiden, besonders PIN und PA, negativ geladen. Diese elektrostatischen Eigenschaften machen sie zu einem besonders häufigen Angriffspunkt vieler antimykotisch-wirkender kationischer Peptide (Rautenbach *et al.*, 2016). Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Lipidomanalyse konnten signifikante Differenzen in der Membranzusammensetzung von KIM01 und KIM01s detektiert werden, die auf eine potentielle Anpassung der Lipidkomposition im Hinblick auf die unterschiedliche Belastung mit K1-Toxin hindeuten. Membranen des Stammes KIM01s wiesen einen signifikant höheren Anteil an Ergosterol im Vergleich zu KIM01 auf. Ergosterol ist hierbei ein essentieller Bestandteil der Plasmamembran, insbesondere der *Lipid rafts*, und hat einen entscheidenden Anteil am Ausprägungsgrad der Membranpermeabilität und -Fluidität. Interessanterweise konnte in dem zuvor durchgeführten Screening unterschiedlicher Deletionsmutanten eine signifikante Verringerung der K1-Sensitivität der Mutanten $\Delta erg4$ und $\Delta erg6$, deren Genprodukte eine essentielle Rolle in der Ergosterolbiosynthese spielen, beobachtet werden. Neben der Modulation der physikochemischen Eigenschaften der Membran *per se*, kann eine Änderung des Ergosterolgehalts durch Änderungen der *Lipid raft*-Komposition bzw. deren Häufigkeit ebenfalls Einfluss auf die Aktivität von Membran-assoziierten Proteinen nehmen (Simons & Ehehalt, 2002; Jacquier & Schneider, 2012). Gleichzeitig führt eine Reduktion von Ergosterol in der Plasmamembran zu einer generellen Verringerung der Endocytose-Frequenz (Degreif *et al.*, 2019). Da die Lipidomanalyse einen Querschnitt der Lipidkomposition aller zellulären Membranen zeigt, sollten in weiterführenden Untersuchungen unterschiedliche Kompartimente zum Ausschluss potentieller Artefakte separat analysiert werden; gleichzeitig kann aufgrund der signifikanten Unterschiede gezeigt werden, dass eine zelluläre Adaptation an die unterschiedlichen extrazellulären K1-Level stattfindet. Besonders die Beobachtung des verringerten Ergosterolgehalts in KIM01 könnte darauf hindeuten, dass Killerzellen dieses Stammes aktiv einer vermehrten Einlagerung des Killertoxins entgegen wirken. Möglicherweise wird durch diese Adaptation aber auch die generelle Verteilung der *Lipid Rafts* verändert, so dass beispielsweise die Häufigkeit der Interaktion von K1 und seinem GPI-verankerten Sekundärrezeptor Kre1p bzw. anderen Effektoren auf Ebene der Plasmamembran verringert werden könnte. Da bis heute zudem nicht gezeigt werden konnte, ob der toxische Mechanismus eine Internalisierung des K1-

Toxins bzw. der toxischen α -Untereinheit umfasst, könnte die Verringerung des Ergosterolgehalts der Plasmamembran auch eine Reduktion der Endocytoserate von K1-Toxinmolekülen bzw. Toxin-Effektor-Komplexen verursachen.

Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Daten kann ein Modell postuliert werden, welches die Vermittlung der intrinsischen Immunität als einen titrierbaren Mechanismus interpretiert, der auf dem Verhältnis von intrazellulär verfügbaren K1-Precursormolekülen und den extrazellulären Toxinmolekülen basiert (**Abb. 54**). Weiterhin scheinen die detektierten zellulären Anpassungen der Killerzellen deutlich von der Menge des jeweils sezernierten Toxins abhängig zu sein. Diese Co-Adaptation der Hefen spielt eine essentielle Rolle für das Überleben der Zellen sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter erhöhten extrazellulären Toxinkonzentrationen; so war lediglich der Killerstamm KIM01, der deutlich höhere Mengen K1 sezerniert, nach Zugabe von extrazellulärem K1-Toxin weiterhin immun. Durch die Hochregulation von Genen diverser Stressabwehrmechanismen könnten Zellen dieses Killerstamms so deutlich leichter mit plötzlich verstärkten Umweltstresssituationen umgehen. Neben der höheren Stresstoleranz konnte eine Lipidomanalyse zusätzlich deutliche Unterschiede zwischen beiden Hefen aufzeigen, die möglicherweise einen Einfluss auf die generelle toxische Wirkung der α -Untereinheit haben könnten, wie beispielsweise die Insertion in die Membran der Wirtszelle. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Killerzellen *per se* nicht vollständig immun gegen den ionophoren Effekt ihres eigenen Killertoxins sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass alternde Killerhefen bzw. Zellen, die einen Anstieg an zellulärem Stress nicht mehr bewältigen können, von ihrem eigenen Toxin abgetötet werden. Dadurch könnten nicht nur Nährstoffe für die übrigen Killerhefen der Kolonie bereitgestellt werden, sondern ein solcher intrinsischer Selektionsmechanismus würde auch die Evolution der Killerhefe-Kolonien in ihrem natürlichen biologischen Habitat gewährleisten. Insgesamt beschreibt das Modell völlig neue Aspekte der K1-Biologie und bietet die Möglichkeit durch weiterführende experimentelle Ansätze, essentielle Fragestellungen der molekularen Mechanismen der Immunität und Toxizität des K1-Killertoxins bearbeiten zu können.

Ausblick

Der Fokus dieser Arbeit lag vor allem auf einer weiterführenden Charakterisierung der toxischen Wirkung des K1-Killertoxins sowie der Aufklärung der molekularen Mechanismen, die an der Vermittlung der Immunität dieses Toxins beteiligt sind. Mit Hilfe der in dieser Arbeit beschriebenen Optimierungen der generellen Toxinproduktion sowie der erfolgreichen Durchführung erster Versuche zur Aufreinigung des Toxins mittels Kationenaustauschchromatographie konnten Grundlagen geschaffen werden, die eine Herstellung von K1-Proteinkristallen ermöglichen könnten. Mit Hilfe von Röntgendiffraktometrie-Analysen könnte so die dreidimensionale Struktur des Toxins aufgeklärt werden. Gleichzeitig könnte das vorgeschlagene Modell zur Lokalisation der intermolekularen Disulfidbrücke, welche die Haupttoxinuntereinheiten verbindet, sowie das Vorkommen potentiell freier Thiole analysiert werden.

Basierend auf dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell zur Prozessierung des Toxin-Heterodimers könnten zukünftige Versuche darauf abzielen, die postulierte Rolle der γ -Untereinheit sowie der Pro-Region genauer zu charakterisieren. Weiterhin könnte die ionophore Wirkung des Toxins in Abhängigkeit der Lipidkomposition der eingesetzten Membran analysiert werden. Die Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen K1-Antikörper, die spezifisch die verschiedenen Untereinheiten erkennen, ermöglicht Lokalisationsstudien, so dass nicht nur der Transport der γ -Untereinheit in Killerhefen analysiert, sondern auch der Verbleib der β -Untereinheit nach Intoxikation von sensitiven Zellen aufgeklärt werden kann. Gleichzeitig könnte untersucht werden, ob K1 oder α -Monomere in der Lage sind, in das Cytosol der Zielzelle zu gelangen und dort den toxischen Effekt ausüben bzw. verstärken.

Die durchgeführte Transkriptomanalyse eines sensitiven Hefestammes ermöglichte die Charakterisierung der bereits jahrzehntelang beschriebenen *Lag*-Phase, die zwischen Toxinzugabe und -wirkung zu beobachten ist. In zukünftigen Untersuchungen könnte die postulierte ATP-abhängige Reparatur der beschädigten Membranabschnitte weiter analysiert werden. Zudem könnten weiterführende Experimente die signifikante De-Regulation unterschiedlicher Gene näher charakterisieren und so aufklären, ob es sich hierbei um eine K1-spezifische oder eine generelle zelluläre Antwort handelt. Weiterhin könnte ein Fokus auf die Beteiligung der Osmolyten Trehalose, Glycogen bzw. Glycerol gelegt werden, welche unterschiedlich bedeutsam in der K1-Biologie zu sein scheinen.

Letztendlich bietet das in dieser Arbeit beschriebene Modell des intrinsischen Selektionsdrucks in Abhängigkeit der Toxinsekretion viele Möglichkeiten, sowohl den Mechanismus der Toxizität als auch der Immunität unter völlig neuen Blickwinkeln zu analysieren. Hierbei wäre neben der Sequenzierung der M₁-Genome beider Stämme auch die Durchführung unterschiedlicher Konkurrenzexperimente interessant. Die weitere Auswertung einer so genannten *Variant Detection*, welche zum Vergleich von potentiellen Insertionen bzw. Deletionen im Genom der untersuchten K1-Killerhefen KIM01 und KIM01s durchgeführt wurde, könnte ebenfalls helfen, Co-Adaptationen beider Hefestämme auf genomischer Ebene in Abhängigkeit der Toxinsekretion zu charakterisieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das viral codierte Killertoxin K1 stellt ein heterodimeres A/B-Toxin dar, welches von Stämmen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sezerniert wird. Nach Bindung an die Zellwand der Zielzelle wird K1 Energie-abhängig zur Plasmamembran transportiert, an welcher es nach Interaktion mit dem Sekundärrezeptor Kre1p als Ionophor wirkt. Durch Bildung von Kationen-selektiven Kanälen kommt es zur Disruption der Plasmamembranintegrität sowie zu einem unkontrollierten Protoneninflux, so dass ein Zusammenbruch des Membranpotentials induziert wird, was zum Absterben einer sensitiven Zelle führt. Trotz jahrzehntelanger Forschung konnte der genaue molekulare Mechanismus der Immunität und der Toxizität dieses Killertoxins noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Neben der Optimierung der Toxinproduktion sowie der generellen Stabilität des Heterodimers wurde in dieser Arbeit durch Mutationsanalysen und unter zu Hilfenahme intrazellulär exprimierter K1-Derivate der Einfluss unterschiedlicher struktureller Komponenten auf die Funktionsweise des Toxins analysiert. Es konnten so nicht nur neue Erkenntnisse hinsichtlich der Vermittlung der Immunität im sekretorischen Weg gewonnen werden, sondern ebenfalls ein Modell postuliert werden, welches eine Inaktivierung der toxischen α -Untereinheit durch die Pro-Region bis zum späten Golgi vorsieht. Weiterhin wurde durch gezielte Substitutionsanalysen erstmals die Ausbildung einer einzelnen intramolekularen Disulfidbrücke experimentell nachgewiesen, wodurch das bis dato geläufige Strukturmodell mit drei Disulfidbrücken aktualisiert werden konnte. Zudem konnten den verbleibenden Cysteinresten essentielle Funktionen hinsichtlich der Ausbildung der Immunität und Toxizität zugeschrieben werden.

Mit Hilfe einer Transkriptomanalyse des K1-sensitiven Hefestammes BY4742 und durch Korrelation der Porenbildung mit der tatsächlichen Abnahme der Zellvitalität konnte in dieser Arbeit erstmals die bereits seit langem beschriebene *Lag*-Phase zwischen Toxinapplikation und letaler Wirkung charakterisiert werden. So wurden unterschiedliche Adaptationen des zellulären Metabolismus detektiert, welche die sensitiven Zellen zumindest initial vor der toxischen Wirkung des K1-Toxins schützen. Basierend auf den Daten der Genexpression und mit Hilfe einer Messung der intra- und extrazellulären ATP-Konzentration wurde eine Akkumulation des Metabolits gezeigt, was möglicherweise auf eine Energie-abhängige Reparatur der geschädigten Membranen hindeutet, die so bereits für bakterielle Zellen beschrieben ist.

Neben der Charakterisierung der Toxinwirkung auf sensitive Zellen wurde zum ersten Mal auch die Wirkung eines Killertoxins auf die Toxin-produzierende Zelle selbst untersucht. Hierzu wurde ein Modellsystem aus zwei K1-Killerhefen, welche distinkte phänotypische Unterschiede aufwiesen, systematisch sowohl auf Transkriptom- als auch auf Lipidomebene analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Killerstämme, welche aktives K1-Toxin sezernieren, nicht nur durch ihren Immunitätsmechanismus vor der Wirkung ihres Toxins geschützt sind, sondern darüber hinaus ihren Metabolismus auch an die Menge des sezernierten Toxins anpassen. Zudem wurde erstmals nachgewiesen, dass Killerhefen auch von der Porenbildung betroffen sind. Mit Hilfe dieses Modells konnte die Ausbildung der Immunität als ein ausbalancierter Mechanismus beschrieben werden, der einen distinkten intrinsischen Selektionsdruck auf die Killerhefe ausübt.

6. LITERATUR

Ahmed A., Sesti F., Ilan N., Shih TM., Sturley S.L., Goldstein SA. (1999) A molecular target for viral killer toxin TOK1 potassium channels. *Cell*. 99(3):283-291.

Ahn IP., Lee YH. (2001) A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria*. *Mol Plant Microbe Interact*. 14(4):496-507.

Allison SD., Chang B., Randolph TW., Carpenter JF. (1999) Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibition of dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys*. 365(2):289-298.

Amoros M., Estruch F. (2001) Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol*. 39(6):1523-1532.

Arnold I., Wagner-Ecker M., Ansoerge W., Langer T. (2006) Evidence for a novel mitochondria-to-nucleus signalling pathway in respiring cells lacking i-AAA protease and the ABC-transporter Mdl1. *Gene*. 367:74-88.

Avery AM., and Avery SV. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem*. 276(36):33730-33735.

Bagnat M., Keranen S., Shevchenko A., Simons K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(7):3254-9.

Beauregard A., Curcio MJ., Belfort M. (2008) The take and give between retrotransposable elements and their hosts. *Annu Rev Genet*. 42:587-617.

Benaroudj N., Lee DH., Goldberg AL. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem*. 276(26):24261-24267.

Bertl A., Ramos J., Ludwig J., Lichtenberg-Frate H., Reid J., Bihler H., Calero F., Martinez P., Ljungdahl PO. (2003) Characterization of potassium transport in wild-type and isogenic yeast strains carrying all combinations of *trk1*, *trk2* and *tok1* null mutations. *Mol Microbiol*. 47(3):767-780.

Bevan EA., Makower M. (1963) The physiological basis of the killer-character in yeast. *Proc Xlth Int Congr Genet Int Congr*. 1:202-203.

Boone C., Bussey H., Greene D., Thomas DY., Vernet T. (1986) Yeast killer toxin: site-directed mutations implicate the precursor protein as the immunity component. *Cell*. 46(1):105-113.

- Boone C., Scidu AM., Wagner J., Degre R., Sanchez C., Bussey H.** (1990) Integration of the yeast K1 killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its effect on vinification. *Am J Enol Vitic.* 41:37-42.
- Bostian KA., Elliott Q., Bussey H., Burn V., Smith A., Tipper DJ.** (1984) Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell.* 36(3):741-751.
- Bostian KA., Jayachandran S., Tipper DJ.** (1983) A glycosylated protoxin in killer yeast: models for its structure and maturation. *Cell.* 32(1):169-180.
- Brachmann CB., Davies A., Cost GJ., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke JD.** (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast.* 14(2):115-132.
- Breinig, F., Schleinkofer K., Schmitt MJ.** (2004) Yeast Kre1p is GPI-anchored and involved in both cell wall assembly and architecture. *Microbiology.* 150:3209-3218.
- Breinig F., Sendzik T., Einfeld K., Schmitt MJ.** (2006) Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(10):3810-3815.
- Breinig F., Tipper DJ., Schmitt MJ.** (2002) Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell.* 108(3):395-405.
- Bussey H.** (1988) Proteases and the processing of precursors to secreted proteins in yeast. *Yeast.* 4(1):17-26.
- Bussey H.** (1991) K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol.* 5(10):2339-2343.
- Bussey H., Boone C., Zhu H., Vernet T., Whiteway M., Thomas DY.** (1990) Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experientia.* 46(2):193-200.
- Bussey H., Saville D., Greene D., Tipper DJ., Bostian KA.** (1983) Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin: processing of the glycosylated precursor. *Mol Cell Biol.* 3(8):1362-1370.
- Bussey, H., Saville D., Hutchins K., Palfree RG.** (1979) Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 140(3):888-892.
- Bussey H., Sherman D.** (1973) Yeast killer factor: ATP leakage and coordinate inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. *Biochim Biophys Acta.* 298(4):868-875.
- Bussey H., Vernet T., Sdicu AM.** (1988) Mutual antagonism among killer yeasts: competition between K1 and K2 killers and a novel cDNA-based K1-K2 killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol.* 34(1):38-44.

- Butler AR., O'Donnell RW., Martin VJ., Gooday GW., Stark MJR.** (1991) *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur J Biochem.* 199:483–488.
- Buzzini P., Martini A.** (2001) Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J Clin Microbiol.* 39(9):3362-3364.
- Calvin NM.; Hanawalt PC.** (1988) High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol.* 170:2796-2801.
- Cartwright CP., Zhu YS., Tipper DJ.** (1992) Efficient secretion in yeast based on fragments from K1 killer preprotoxin. *Yeast.* 8(4):261-272.
- Caston JR., Trus BL., Booy FP., Wickner RB., Wall JS., Steven AC.** (1997) Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol.* 138(5):975-985.
- Cooper A., Bussey H.** (1989) Characterization of the yeast KEX1 gene product: a carboxypeptidase involved in processing secreted precursor proteins. *Mol Cell Biol.* 9(6):2706-2714.
- da Costa Morato Nery D., da Silva CG., Mariani D., Fernandes PN., Pereira MD., Panek AD., Eleutherio EC.** (2008) The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1780(12):1408-1411.
- de la Pena P., Barros F., Gascon S., Lazo PS., Ramos S.** (1981) Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 256(20):10420-10425.
- de la Pena, P., Barros F., Gascon S., Ramos S., Lazo PS.** (1980) Primary effects of yeast killer toxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 96(2):544-550.
- Degreif D., Cucu B., Budin I., Thiel G., Bertl A.** (2019) Lipid determinants of endocytosis and exocytosis in budding yeast. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 1864(7):1005-1016.
- Delaunay A., Pflieger D., Barrault MB., Vinh J., Toledano MB.** (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell.* 111(4):471-481.
- Denis V., Daignan-Fornier B.** (1998) Synthesis of glutamine, glycine and 10-formyl tetrahydrofolate is coregulated with purine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 259(3):246-255.
- Diezmann S., Cox CJ., Schonian G., Vilgalys RJ., Mitchell TG.** (2004) Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J Clin Microbiol.* 42(12):5624-5635.
- Dignard D., Whiteway M., Germain D., Tessier D., Thomas DY.** (1991) Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol Gen Genet.* 227(1):127-136.

- Dinman J.D., Wickner RB.** (1992) Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol.* 66(6):3669-3676.
- Dinman J.D., Wickner RB.** (1994) Translational maintenance of frame: mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with altered -1 ribosomal frameshifting efficiencies. *Genetics.* 136(1):75-86.
- Dmochowska A., Dignard D., Henning D., Thomas DY., Bussey H.** (1987) Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell.* 50(4):573-584.
- Douglas CM., Sturley SL., Bostian KA.** (1988) Role of protein processing, intracellular trafficking and endocytosis in production of and immunity to yeast killer toxin. *Eur J Epidemiol.* 4(4):400-408.
- Dower WJ., Miller JF., Ragsdale CW.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res.* 16:6127-6145.
- El-Sherbeini M., Bostian KA.** (1987) Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:4293-4297.
- Esteban R., Vega L., Fujimura T.** (2008) 20S RNA narnavirus defies the antiviral activity of SKI1/XRN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 283(38):25812-25820.
- Esteban R., Wickner RB.** (1986) Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol Cell Biol.* 6(5):1552-1561.
- Ferrigno P., Posas F., Koepf D., Saito H., Silver PA.** (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* 17(19):5606-5614.
- Flegelova H., Novotna D., Vojtiskova K., Janderova B.** (2002) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with a different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Res.* 2(1):73-79.
- Forsburg SL., Guarente L.** (1989) Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* 3(8):1166-1178.
- Fujimura T., Esteban R.** (2019) The cap-snatching reaction of yeast L-A double-stranded RNA virus is reversible and the catalytic sites on both Gag and the Gag domain of Gag-Pol are active. *Mol Microbiol.* 111(2):395-404.
- Fujimura T., Esteban R., Esteban LM., Wickner RB.** (1990) Portable encapsidation signal of the L-A double-stranded RNA virus of *S. cerevisiae*. *Cell.* 62(4):819-828.
- Fujimura T., Wickner RB.** (1992) Interaction of two cis sites with the RNA replicase of the yeast L-A virus. *J Biol Chem.* 267(4):2708-2713.

- Furuchi T., Ishikawa H., Miura N., Ishizuka M., Kajiya K., Kuge S., Naganuma A.** (2001) Two nuclear proteins, Cin5 and Ydr259c, confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol.* 59(3):470-474.
- Gasch AP., Spellman PT., Kao CM., Carmel-Harel O., Eisen MB., Storz G., Botstein D., Brown PO.** (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell.* 11(12):4241-4257.
- Gier S., Schmitt MJ., Breinig F.** (2017) Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins.* 9(11).
- Gier S., Simon M., Nordström K., Khalifa S., Schulz MH., Schmitt MJ., Breinig F.** (2019a) Transcriptome kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in response to viral killer toxin K1. *Front Microbiol.* 10:1102.
- Gier S., Lermen M., Schmitt MJ., Breinig F.** (2019b) Substitution of cysteines in the yeast viral killer toxin K1 precursor reveals novel insights in heterodimer formation and immunity. *Sci Rep.* 9(1):13127.
- Gier S., Simon M., Gasparoni G., Khalifa S., Schulz MH., Schmitt MJ., Breinig F.** (2019c) Yeast viral killer toxin K1 induces specific host cell adaptations via intrinsic selection pressure. *Zur Publikation eingereicht.*
- Gier S., Schmitt MJ., Breinig F.** (2019d) Analysis of yeast killer toxin K1 precursor processing via site-directed mutagenesis. *Zur Publikation eingereicht.*
- Gonzalez MR., Bischofberger M., Freche B., Ho S., Parton RG., van der Goot FG.** (2011) Pore-forming toxins induce multiple cellular responses promoting survival. *Cell Microbiol.* 13(7):1026-1043.
- Gorner W., Durchschlag E., Martinez-Pastor MT., Estruch F., Ammerer G., Hamilton B., Ruis H., Schullern C.** (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12(4):586-597.
- Grant CM.** (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol.* 39(3):533-541.
- Gunge N., Tamaru A., Ozawa F., Sakaguchi K.** (1981) Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol.* 145(1):382-390.
- Hanes SD., Burn VE., Sturley SL., Tipper DJ., Bostian KA.** (1986) Expression of a cDNA derived from the yeast killer preprotoxin gene: implications for processing and immunity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(6):1675-1679.

- Hansen W., Garcia PD., Walter P.** (1986) In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent post-translational translocation of the prepro-alpha-factor. *Cell*. 45(3):397-406.
- Hayman GT., Bolen PL.** (1991) Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet*. 19:389-93.
- Heerde E., Radler F.** (1978) Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*.
- Hegde RS., Bernstein HD.** (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci*. 31(10):563-571.
- Heiligenstein, S., Einfeld K., Sendzik T., Jimenez-Becker N., Breinig F., Schmitt MJ.** (2006) Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. *EMBO J*. 25(20):4717-4727.
- Hodgson VJ., Button D., Walker GM.** (1995) Anti-*Candida* activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol*. 141:2003-12.
- Hutchins K., Bussey H.** (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1,6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol*. 154(1):161-169.
- Icho T., Wickner RB.** (1989) The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J Biol Chem*. 264(12):6716-6723.
- Inoue Y., Matsuda T., Sugiyama K., Izawa S., Kimura A.** (1999) Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 274(38):27002-27009.
- Isom DG., Page SC., Collins LB., Kapolka NJ., Taghon GJ., Dohlman HG.** (2018) Coordinated regulation of intracellular pH by two glucose-sensing pathways in yeast. *J Biol Chem*. 293(7):2318-2329.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A.** (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*. 153(1):163-168.
- Jablonowski D., Schaffrath R.** (2008) Zymocin, a composite chitinase and tRNAse killer toxin from yeast. *Biochem Soc Trans*. 35:1533-7.
- Jacquier N., Schneiter R.** (2012) Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 129(1-2):70-78.
- Jang HH., Lee KO., Chi YH., Jung BG., Park SK., Park JH., Lee JR., Lee SS., Moon JC, Yun JW., Choi YO., Kim WY., Kang JS., Cheong GW., Yun DJ., Rhee SG., Cho MJ., Lee SY.** (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*. 117(5):625-635.

- Javadekar VS., SivaRaman H., Gokhale DV.** (1995) Industrial yeast strain improvement: construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *J Ind Microbiol.* 15:94-102.
- Jelinsky SA., Samson LD.** (1999) Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(4):1486-1491.
- Jungnickel B., Rapoport TA.** (1995) A post-targeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* 82(2):261-270.
- Kagan BL.** (1983) Mode of action of yeast killer toxins: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature.* 302(5910):709-711.
- Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg AL.** (2004) Yeast adapt to near-freezing temperatures by *STRE/Msn2,4*-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell.* 13(6):771-781.
- Kim JM., Vanguri S., Boeke JD., Gabriel A., Voytas DF.** (1998) Transposable elements and genome organization: a comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Res.* 8(5):464-478.
- Kinal H., Park CM., Berry JO., Koltin Y., Bruenn JA.** (1995) Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell.* 7(6):677-688.
- Klipp E., Nordlander B., Kruger R., Gennemark P., Hohmann S.** (2005) Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nat Biotechnol.* 23(8):975-982.
- Klose C., Surma MA., Gerl MJ, Meyenhofer F., Shevchenko A., Simons K.** (2012) Flexibility of a eukaryotic lipidome-insights from yeast lipidomics. *PLoS One.* 7(4):e35063.
- Kurzweilova H., Sigler K.** (1995) Comparison of three different methods for determining yeast killer toxin K1 activity and standardisation of units. *Experientia.* 51(1):26-28.
- Larimer FW., Hsu CL., Maupin MK., Stevens A.** (1992) Characterization of the *XRN1* gene encoding a 5'→3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted yeast cells. *Gene.* 120(1):51-57.
- Lascaris R., Bussemaker HJ., Boorsma A., Piper M., van der Spek H., Grivell L., Blom J.** (2003) Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.* 4(1):R3.
- Lesage P., Todeschini AL.** (2005) Happy together: the life and times of Ty retrotransposons and their hosts. *Cytogenet Genome Res.* 110(1-4):70-90.
- Levin, DE.** (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(2):262-291.

- Luongo CL., Reinisch KM., Harrison SC., Nibert ML.** (2000) Identification of the guanylyltransferase region and active site in reovirus mRNA capping protein lambda2. *J Biol Chem.* 275(4):2804-2810.
- Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L.** (1997) Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev.* 10(3):369-400.
- Martin M.** (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 17:10-12.
- Martinac B., Zhu H., Kubalski A., Zhou XL., Culbertson M., Bussey H., Kung C.** (1990) Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(16):6228-6232.
- Martinez-Munoz GA., Kane P.** (2008) Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem.* 283(29):20309-20319.
- Martinez-Pastor MT., Marchler G., Schuller C., Marchler-Bauer A., Ruis H., Estruch F.** (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE) *EMBO J.* 15(9):2227-2235.
- Mendizabal I., Rios G., Mulet JM., Serrano R., de Larrinoa IF.** (1998) Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* 425(2):323-328.
- Middelbeek EJ., Hermans J., Stumm CK.** (1979) Production, purification and properties of a *Pichia kluyveri* killer toxin *Antonie van Leeuwenhoek.* DOI:10.1007/BF00443282.
- Morsomme P., Slayman CW., Goffeau A.** (2000) Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1469(3):133-157.
- Naitow H., Tang J., Canady M., Wickner RB., Johnson JE.** (2002) L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat Struct Biol.* 9(10):725-8.
- Navarre C., Catty P., Leterme S., Dietrich F., Goffeau A.** (1994) Two distinct genes encode small isoproteolipids affecting plasma membrane H⁺-ATPase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 269(33):21262-21268.
- Novotná D., Flegelová H., Janderová B.** (2004) Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4(8):803-13.

- Page N., Gerard-Vincent M., Menard P., Beaulieu M., Azuma M., Dijkgraaf GJ., Li H., Marcoux J., Nguyen T., Dowse T., Sdicu AM., Bussey H.** (2003) A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics*. 163(3):875-894.
- Palfree RG., Bussey H.** (1979) Yeast killer toxin: purification and characterisation of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 93(3):487-493.
- Park CM., Berry JO., Bruenn JA.** (1996) High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*. 30(2):359-366.
- Park SG., Cha MK., Jeong W., Kim IH.** (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 275(8):5723-5732.
- Parrou JL., Enjalbert B., Plourde L., Bauche A., Gonzalez B., Francois J.** (1999) Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15(3):191-203.
- Parrou JL., Teste MA., Francois J.** (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*. 143:1891-1900.
- Patel A., Malinowska L., Saha S., Wang J., Alberti S., Krishnan Y., Hyman AA.** (2017) ATP as a biological hydrotrope. *Science*. 356(6339):753-756.
- Park CM., Bruenn JA., Ganesa C., Flurkey WF., Bozarth RF., Koltin Y.** (1994) Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol*. 11:155-64.
- Patro R., Duggal G., Love MI., Irizarry RA., Kingsford C.** (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods*. 14(4):417-+.
- Pereira Ede J., Panek AD., Eleutherio EC.** (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones*. 8(2):120-124.
- Pfeiffer P., Radler F.** (1982) Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol*. 128:2699-2706.
- Pieczynska MD., de Visser JA., Korona R.** (2013) Incidence of symbiotic dsRNA 'killer' viruses in wild and domesticated yeast. *FEMS Yeast Res*. 13(8):856-859.
- Pieczynska MD., Korona R., de Visser JA.** (2017) Experimental tests of host-virus coevolution in natural killer yeast strains. *J Evol Biol*. 30(4):773-781.
- Pintar J., Starmer WT.** (2003) The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 83(1):89-97.

- Piper MD., Hong SP., Ball GE., Dawes IW.** (2000) Regulation of the balance of one-carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275(40):30987-30995.
- Plotch SJ, Bouloy M., Ulmanen I., Krug RM.** (1981) A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell.* 23:847–858.
- Polevoda B., Sherman F.** (2001) NatC N(alpha)-terminal acetyltransferase of yeast contains three subunits, Mak3p, Mak10p, and Mak31p. *J Biol Chem.* 276(23):20154-20159.
- Polonelli L., Conti S.** (2009) Biotyping of *Candida albicans* and other fungi by yeast killer toxins sensitivity. *Methods Mol Biol.* 499:97-115.
- Qi M., Elion EA.** (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci.* 118:3569-3572.
- Rand JD., Grant CM.** (2006) The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell.* 17(1):387-401.
- Rao R., Nakamoto RK., Verjovski-Almeida S., Slayman CW.** (1992) Structure and function of the yeast plasma-membrane H⁺-ATPase. *Ann NY Acad Sci.* 671:195-203.
- Rautenbach M., Troskie AM., Vosloo JA.** (2016) Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie.* 130:132-145.
- Reiser V., Ruis H., Ammerer G.** (1999) Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 10(4):1147-1161.
- Reiter J.** (2004) Untersuchung und strukturelle Analyse viraler dsRNA-Genome aus der Hefe *Zygosaccharomyces bailii*. Dissertation. Universität des Saarlandes.
- Reiter J., Herker E., Madeo F., Schmitt MJ.** (2005) Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* 168(3):353-358.
- Rep M., Krantz M., Thevelein JM., Hohmann S.** (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem.* 275(12):8290-8300.
- Rep M., Reiser V., Gartner U., Thevelein JM., Hohmann S., Ammerer G., Ruis H.** (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol.* 19(8):5474-5485.
- Riffer F., Eisfeld K., Breinig F., Schmitt MJ.** (2002) Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 148:1317-1328.

- Robinson JS., Klionsky DJ., Banta LM., Emr SD.** (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol.* 8(11):4936-48.
- Rodriguez-Cousino N., Maqueda M., Ambrona J., Zamora E., Esteban R., Ramirez M.** (2011) A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl Environ Microbiol.* 77(5):1822-1832.
- Roemer T., Bussey H.** (1995) Yeast Kre1p is a cell surface O-glycoprotein. *Mol Gen Genet.* 249(2):209-216.
- Rowley PA.** (2017) The frenemies within: viruses, retrotransposons and plasmids that naturally infect *Saccharomyces* yeasts. *Yeast.* 34(7):279-292.
- Salek AT.** (2003) Influence of yeast killer toxins on the cytotoxicity of Shiga-like toxins. *Biotechnologia.* 1:244-256.
- Santos A., Del Mar Alvarez M., Mauro MS., Abrusci C., Marquina D.** (2005) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *J Biol Chem.* 280(51):41881-41892.
- Santos A., Marquina D.** (2004) Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast.* 21(2):151-162.
- Sasidharan K., Soga T., Tomita M., Murray DB.** (2012) A yeast metabolite extraction protocol optimised for time-series analyses. *PLoS One.* 7(8):e44283.
- Sbia M., Parnell EJ., Yu Y., Olsen AE., Kretschmann KL., Voth WP., Stillman DJ.** (2008) Regulation of the yeast Ace2 transcription factor during the cell cycle. *J Biol Chem.* 283(17):11135-11145.
- Schmitt AP., McEntee K.** (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(12):5777-5782.
- Schmitt MJ.** (1995) Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol Gen Genet.* 246(2):236-246.
- Schmitt MJ., Breinig F.** (2002) The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev.* 26(3):257-276.
- Schmitt MJ., Breinig F.** (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol.* 4(3):212-221.
- Schmitt MJ., Klavehn P., Wang J., Schonig I., Tipper DJ.** (1996) Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology.* 142:655-2662.

- Schmitt MJ., Poravou O., Trenz K., Rehfeldt K.** (1997) Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J Virol.* 71(11):8852-8855.
- Schmitt MJ., Schernikau G.** (1997) Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food technol biotechnol.* 35:281-285.
- Schmitt MJ., Tipper DJ.** (1990) K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 10(9):4807-4815.
- Schmitt MJ., Tipper DJ.** (1992) Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast.* 8(5):373-384.
- Schmitt MJ., Tipper DJ.** (1995) Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology.* 213(2):341-351.
- Sehn, M.** (2005) Phäno- und genotypische Charakterisierung eines aus Wein isolierten Kilerstammes der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes.
- Selitrennikoff CP.** (2001) Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol.* 67(7):2883-2894.
- Sendzik, T.** (2003) Untersuchung der *in vivo* Toxizität und Immunität der α/β -heterodimer Virustoxine K1 und K28 durch regulierte Expression einzelner Toxinuntereinheiten. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes.
- Serrano R., Kielland-Brandt MC., Fink GR.** (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$, K^+ - and Ca^{2+} -ATPases. *Nature.* 319(6055):689-693.
- Serviene E., Luksa J., Orentaite I., Lafontaine DL., Urbonavicius J.** (2012) Screening the budding yeast genome reveals unique factors affecting K2 toxin susceptibility. *PLoS One.* 7(12):e50779.
- Sesti F., Shih TM., Nikolaeva N., Goldstein SA.** (2001) Immunity to K1 killer toxin: internal TOK1 blockade. *Cell.* 105(5):637-644.
- Shi X., Zou Y., Chen Y., Ying H.** (2018) Overexpression of *THI4* and *HAP4* improves glucose metabolism and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol.* 9:1444.
- Sikorski, RS., Hieter P.** (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 122, 19-27.
- Simons K., Eehalt R.** (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 110(5):597-603.
- Skipper N., Bussey H.** (1977) Mode of action of yeast toxins: energy requirement for *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin. *J Bacteriol.* 129(2):668-677.

- Sturley SL., Elliot Q., LeVitre J., Tipper DJ., Bostian KA.** (1986) Mapping of functional domains within the *Saccharomyces cerevisiae* type 1 killer preprotoxin. *Embo J.* 5(12):3381-3389.
- Suhm T., Ott M.** (2017) Mitochondrial translation and cellular stress response. *Cell Tissue Res.* 367(1):21-31.
- Suzuki Y., Schwartz SL., Mueller NC., Schmitt MJ.** (2017) Cysteine residues in a yeast viral A/B toxin crucially control host cell killing via pH-triggered disulfide rearrangements. *Mol Biol Cell.* 28(8):1123-1131.
- Szekely M., Loviny T.** (1975) 5'-terminal phosphorylation and secondary structure of double-stranded RNA from a fungal virus. *J Mol Biol.* 92:79437.
- Tercero JC., Dinman JD., Wickner RB.** (1993) Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus. *J Bacteriol.* 175(10):3192-3194.
- Tercero JC., Wickner RB.** (1992) MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of the L-A gag NH₂ terminus is necessary for virus particle assembly. *J Biol Chem.* 267(28):20277-20281.
- Theisen S., Molkenau E., Schmitt MJ.** (2000) Wicaltin, a new protein toxin secreted by the yeast *Williopsis californica* and its broad-spectrum antimycotic potential. *J Microbiol Biotechnol.* 10(547-550).
- Thevissen K., Ghazi A., de Samblanx GW., Brownlee C., Osborn RW., Broekaert WF.** (1996) Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *J Biol Chem.* 271(25):15018-15025.
- Thevissen K., Osborn RW., Acland DP., Broekaert WF.** (1997) Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *J Biol Chem.* 272(51):32176-32181.
- Tibbetts AS., Appling DR.** (2000) Characterization of two 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase/inosine monophosphate cyclohydrolase isozymes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275(27):20920-20927.
- Tipper DJ., Bostian KA.** (1984) Double-stranded ribonucleic acid killer systems in yeasts. *Microbiol Rev.* 48:125-156.
- Tipper DJ., Schmitt MJ.** (1991) Yeast dsRNA viruses: replication and killer phenotypes. *Mol Microbiol.* 5(10):2331-2338.
- Toh-e E., Guerry AP., Wickner RB.** (1978) Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 136(3):1002-1007.

- Torres-Quiroz F., Garcia-Marques S., Coria R., Randez-Gil F., Prieto JA.** (2010) The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *J Biol Chem.* 285(26):20088-20096.
- Trotter EW., Grant CM.** (2002) Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 46(3):869-878.
- Valis K., Masek T., Novotna D., Pospisek M., Janderova B.** (2006) Immunity to killer toxin K1 is connected with the Golgi-to-vacuole protein degradation pathway. *Folia Microbiol (Praha).* 51(3):196-202.
- van Meer G., Voelker DR., Feigenson GW.** (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(2):112-24.
- Warner JR.** (1999) The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci.* 24(11):437-440.
- Weiler F., Schmitt MJ.** (2003) Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* 3(1):69-76.
- Wickner RB.** (1989) Yeast virology. *FASEB J.* 3(11):2257-2265.
- Wickner RB.** (1992) Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol.* 46:347-375.
- Wickner RB.** (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 60(1): 250-265.
- Wickner RB., Bussey H., Fujimura T., Esteban R.** (1995) Viral RNA and the killer phenomenon of *Saccharomyces*. In: Kück U. (eds) *Genetics and Biotechnology. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, 2. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wickner RB., Icho T., Fujimura T., Widner WR.** (1991) Expression of yeast L-A double-stranded RNA virus proteins produces derepressed replication: a ski-phenocopy. *J Virol.* 65(1):155-161.
- Wickner RB., Leibowitz MJ.** (1979) Mak mutants of yeast: mapping and characterization. *J Bacteriol.* 140(1):154-160.
- Winston F., Dollard C., Ricupero-Hovasse SL.** (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast.* 11(1):53-5.
- Workman CT., Mak HC., McCuine S., Tagne JB., Agarwal M., Ozier O., Begley TJ., Samson LD., Ideker T.** (2006) A systems approach to mapping DNA damage response pathways. *Science.* 312(5776):1054-1059.

Wrobel L., Topf U., Bragoszewski P., Wiese S., Sztolsztener ME., Oeljeklaus S., Varabyova S., Lirski M., Chroscicki P., Mroczek S., Januszewicz E., Dziembowski A., Koblowska M., Warscheid B., Chacinska A. (2015) Mistargeted mitochondrial proteins activate a proteostatic response in the cytosol. *Nature*. 524(7566):485-488.

Wu H., Ng BS., Thibault G. (2014) Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep*. 34(4).

Yancey PH. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol*. 208(Pt 15):2819-2830.

Yokomori Y., Akiyama H., Schimizu K. (1988) Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric Biol Chem*. 52:2791-2796.

Zampar GG., Kummel A., Ewald J., Jol S., Niebel B., Picotti P., Aebersold R., Sauer U., Zamboni N., Heinemann M. (2013) Temporal system-level organization of the switch from glycolytic to gluconeogenic operation in yeast. *Mol Syst Biol*. 9:651.

Zhou Z., Elledge SJ. (1993) DUN1 encodes a protein kinase that controls the DNA damage response in yeast. *Cell*. 75(6):1119-1127.

Zhu H., Bussey H. (1989) The K1 toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl Environ Microbiol*. 55:2105-2107.

Zhu H., Bussey H. (1991) Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol Cell Biol*. 11(1):175-181.

Zhu H., Bussey H., Thomas DY, Gagnon J, Bell AW. (1987) Determination of the carboxyl termini of the alpha and beta subunits of yeast K1 killer toxin. Requirement of a carboxypeptidase B-like activity for maturation. *J Biol Chem*. 262(22):10728-10732.

Zhu YS., Kane J., Zhang XY, Zhang M., Tipper DJ. (1993) Role of the gamma component of preprotoxin in expression of the yeast K1 killer phenotype. *Yeast*. 9(3):51-266.

Zhu YS., Zhang XY., Cartwright CP., Tipper DJ. (1992) Kex2-dependent processing of yeast K1 killer preprotoxin includes cleavage at ProArg-44. *Mol Microbiol*. 6(4):511-520.

7. ANHANG

Charakterisierung K1-spezifischer Antikörper

Zur qualitativen Analyse der Spezifität der unterschiedlichen Antikörper (**Tabelle 9**) wurden die Proteine eines K1-Toxinkonzentrates (JG-Medium) mittels TCA-Zugabe präzipitiert und in nicht-reduzierendem bzw. reduzierendem (10 % β -Mercaptoethanol) SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die erhaltenen Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt, 1:2 und 1:5) zur SDS-PAGE eingesetzt (**Abb. S1**).

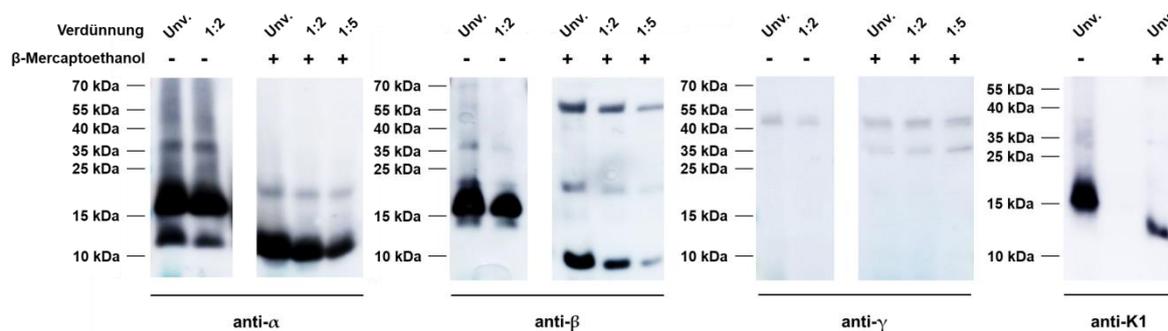


Abbildung S1: Untersuchung der Spezifität von K1-Antikörpern in zellfreiem Überstand. K1-Toxinkonzentrat des Killerstammes T158c wurde in JG-Medium hergestellt und Proteine wurden durch Zugabe von TCA präzipitiert. Resultierende Pellets wurden in nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer (-) bzw. reduzierendem Probenpuffer (β -Mercaptoethanol, +) resuspendiert und in unterschiedlichen Verdünnungen zur SDS-PAGE (unverdünnt, 1:2, 1:5) eingesetzt. Primäre Antikörper gegen die α -Untereinheit (anti- α), β -Untereinheit (anti- β) bzw. γ -Untereinheit (anti- γ) wurden in einer 1:1.000-Verdünnung eingesetzt; als Kontrolle wurde zudem ein Antikörper gegen das K1-Heterodimer eingesetzt (anti-K1, 1:1.000). Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte (n = 2).

Sowohl für den untersuchten anti- α - als auch den anti- β -Antikörper wurden spezifische Signale für das K1-Heterodimer (18 kDa) unter nicht-reduzierten Bedingungen sowie für die entsprechenden Untereinheiten (ca. 10 kDa) unter reduzierenden Bedingungen detektiert. Nach Verwendung eines anti- γ -Antikörpers wurden keine Banden dokumentiert, die speziell dieser K1-Untereinheit zugeordnet werden konnten; lediglich schwache kreuzreaktive Banden mit einer Laufhöhe von ungefähr 45 kDa wurden beobachtet (**Abb. S1**).

Da die Antikörper auch zur intrazellulären Detektion der Untereinheiten verwendet werden sollen, wurde im Folgenden ihre Spezifität in Proben aufgeschlossener Zellen analysiert. Hierzu wurden Hefen des Killerstammes T158c in reduzierendem SUMEB-Puffer mittels Glasperlen aufgeschlossen; als Kontrolle dienten Leervektor-transformierte Zellen, die

zuvor zwei Tage in Galactose-haltigem Ura d/o Medium kultiviert wurden (30 °C, 200 rpm), (**Abb. S2**).

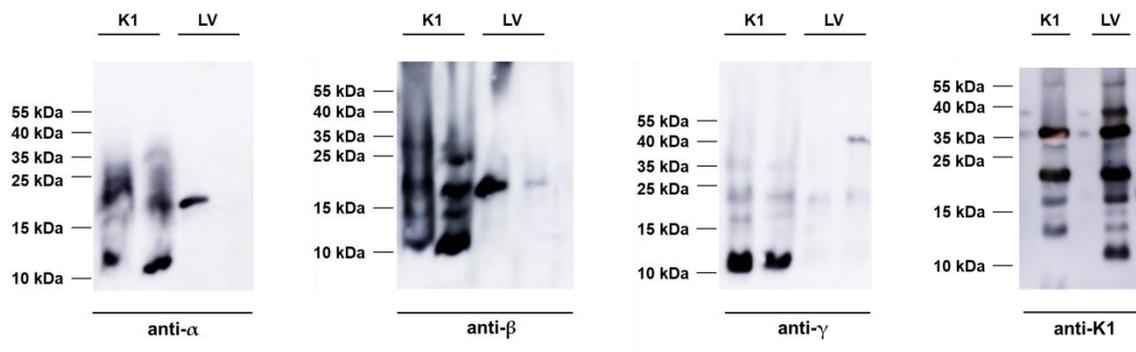


Abbildung S2: Untersuchung der intrazellulären Spezifität von K1-spezifischen Antikörpern. Zellen des K1-Toxin-produzierenden Killerstammes T158c (K1) sowie Leervektor-transformierte Zellen des Stammes BY4742 (pYES2.1, LV) wurden in reduzierendem SUMEB-Puffer durch Glasperlen aufgeschlossen. Die erhaltenen Proben wurden zur SDS-PAGE eingesetzt und Proteine wurden auf PVDF-Membranen immobilisiert. Primäre Antikörper gegen die unterschiedlichen Toxinuntereinheiten (anti- α , anti- β und anti- γ) wurden in einer 1:1.000-Verdünnung eingesetzt; als Kontrolle wurde zudem ein K1-Heterodimer-spezifischer Antikörper (anti-K1, 1:1.000) eingesetzt. Dargestellt sind repräsentative Bildausschnitte (n = 2).

Analog zu den Ergebnissen des Überstandes wurden auch in den Zellaufschlüssen des K1-Killers distinkte Toxin-spezifische Banden detektiert (**Abb. S2**). Deutlich wurde allerdings, dass Antikörper gegen die α - sowie die β -Untereinheit eine Kreuzreaktion in Leervektor-exprimierenden Zellen mit einer Höhe von ca. 20-23 kDa hervorriefen, die ebenfalls in Proben von Zellaufschlüssen der Killerhefe auftraten und somit nicht spezifisch für die Untereinheiten des K1-Toxins sind. Durch Einsatz des γ -Antikörpers (anti- γ) wurden distinkte Banden mit einer Laufhöhe von ungefähr 10 kDa detektiert. Zudem wurde bei Verwendung dieses Antikörpers eine sehr geringe Kreuzreaktivität, sowohl mit anderen Proteinen der Killerhefe als auch mit Proteinen der Leervektor-transformierten Zellen, festgestellt (**Abb. S2**).

Tabelle 13: Lipidspezies [mol-%] im Verhältnis zur Gesamtlipidmenge. DAG: Diacylglycerol, EE: Ergosterolester, PA: Phosphatidsäure, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin; PG: Phosphatidylglycerol, PIN: Phosphatidylinositol, PS: Phosphatidylserin, TAG: Triacylglycerol.

Lipid- spezies	KIM01s				KIM01			
	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mittelwert	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mittelwert
DAG 30:1	0	0,063	0	0,021	0,077	0	0,113	0,063
DAG 31:1	0	0	0	0	0	0	0,177	0,059
DAG 32:1	0,240	0,256	0,226	0,240	0,349	0,294	0,307	0,316
DAG 32:2	0,239	0,193	0,166	0,199	0,226	0,244	0,244	0,238
DAG 33:1	0	0,049	0,092	0,047	0	0	0	0
DAG 34:1	0,615	0,564	0,462	0,547	0,695	0,437	0,461	0,531
DAG 34:2	0,485	0,354	0,279	0,373	0,336	0,356	0,333	0,342
DAG 36:1	0,272	0,225	0,214	0,237	1,744	0,178	0,249	0,724
DAG 36:2	0,114	0,092	0,101	0,102	0,116	0,103	0,114	0,111
EE 12:0	0,429	0,216	0,238	0,294	0	0,201	0	0,067
EE 12:1	0,573	0	0	0,191	0	0,217	0	0,072
EE 14:0	0,631	0,123	0	0,251	0	0,264	0	0,088
EE 14:1	0,879	0,150	0	0,343	0	0,359	0	0,120
EE 16:0	1,213	1,221	1,329	1,254	1,074	1,049	0,992	1,038
EE 16:1	12,323	13,499	13,493	13,105	9,582	8,839	8,679	9,033
EE 17:0	0	1,988	2,085	1,358	0	0	0	0
EE 18:1	5,254	5,128	5,861	5,414	3,779	3,318	3,872	3,656
EE 18:2	0	0,542	0	0,181	0	0,399	0	0,133
EE 18:3	0	0,930	0,944	0,625	0,923	0,877	1,561	1,120
EE 19:0	0	0,155	0	0,052	0	0	0	0
PA 26:0	0	0	0	0	0	0,032	0,039	0,024
PA 28:0	0	0	0	0	0	0	0,027	0,009
PA 28:1	0	0	0	0	0,021	0	0	0,007
PA 30:1	0	0,016	0	0,005	0,031	0,032	0,030	0,031
PA 31:1	0	0	0,262	0,087	0	0	0	0
PA 32:1	0,098	0,083	0,089	0,090	0,116	0,118	0,107	0,114
PA 32:2	0,094	0,077	0,068	0,080	0,102	0,117	0,100	0,106
PA 34:1	0,162	0,163	0,162	0,163	0,154	0,163	0,146	0,154
PA 34:2	0	0,126	0	0,042	0	0	0	0
PA 44:2	0,038	0	0	0,013	0	0	0	0
PC 28:0	0,044	0,040	0,047	0,044	0,065	0,065	0,066	0,065
PC 28:1	1,070	1,191	1,253	1,171	2,088	1,872	2,166	2,042
PC 28:2	0	0,025	0,023	0,016	0,047	0,043	0,039	0,043
PC 29:1	0,510	0,456	0,480	0,482	0,698	0,640	0,745	0,694
PC 30:1	0,322	0,326	0,297	0,315	0,465	0,496	0,458	0,473
PC 30:2	0,137	0,134	0,137	0,136	0,226	0,222	0,197	0,215
PC 31:2	1,477	1,271	1,329	1,359	1,682	1,584	1,813	1,693
PC 32:1	0,810	0,863	0,758	0,810	1,081	1,145	1,002	1,076
PC 32:2	3,324	3,390	3,138	3,284	4,373	4,627	4,194	4,398
PC 32:3	0	0	0	0	0	0,023	0	0,008
PC 33:1	0,053	0,070	0,063	0,062	0,077	0,078	0,083	0,079
PC 33:2	0,254	0,246	0,247	0,249	0,360	0,348	0,320	0,342
PC 34:1	0,554	0,598	0,570	0,574	0,638	0,677	0,622	0,645
PC 34:2	3,798	3,819	3,587	3,735	4,175	4,301	3,988	4,155
PC 34:3	0,022	0,028	0,030	0,027	0,035	0,038	0	0,025
PC 36:1	0,175	0,189	0,176	0,180	0,160	0,163	0,168	0,164
PC 36:2	0,490	0,497	0,459	0,482	0,474	0,500	0,461	0,479
PE 26:0	0,035	0	0	0,012	0	0,066	0,070	0,046
PE 26:1	0	0	0	0	0,044	0	0	0,015
PE 28:0	0,038	0,048	0	0,029	0,066	0,069	0,067	0,068
PE 28:1	0,060	0,070	0,058	0,063	0,105	0,106	0,101	0,104
PE 30:1	0,150	0,157	0,168	0,158	0,212	0,251	0,235	0,233

Tabelle 13: Fortsetzung

Lipid- spezies	KIM01s				KIM01			
	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mittelwert	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mittelwert
PE 30:2	0	0	0	0	0,030	0,026	0,038	0,031
PE 31:1	0,083	0,080	0,381	0,181	0,096	0,082	0,108	0,095
PE 32:1	1,568	1,559	1,679	1,602	2,014	2,098	1,995	2,036
PE 32:2	1,489	1,481	1,616	1,528	1,875	2,020	1,915	1,937
PE 33:1	0,055	0,056	0	0,037	0,073	0,066	0,075	0,071
PE 33:2	0,042	0,041	0	0,028	0,110	0,082	0,099	0,097
PE 34:1	2,598	2,668	2,845	2,703	2,794	2,921	2,775	2,830
PE 34:2	4,395	4,269	4,507	4,390	4,622	4,787	4,639	4,683
PE 35:2	0,071	0,049	0,059	0,060	0,107	0,105	0,101	0,105
PE 36:1	0,132	0,114	0,139	0,128	0,134	0,139	0,146	0,140
PE 36:2	0,511	0,522	0,564	0,533	0,572	0,614	0,577	0,587
PG 31:1	0,052	0	0,017	0,023	0	0,024	0,023	0,016
PG 32:1	0	0,013	0	0,004	0	0	0	0
PG 34:1	0,032	0,032	0	0,021	0,028	0,027	0,026	0,027
PIN 24:0	0	0,075	0,075	0,050	0	0,188	0,220	0,136
PIN 24:1	0	0	0	0	0	0,019	0	0,006
PIN 26:0	0,885	0,784	0,821	0,830	1,448	1,564	1,715	1,576
PIN 26:1	0,189	0,153	0,156	0,166	0,290	0,329	0,379	0,333
PIN 27:0	0	0	0	0	0,028	0,029	0	0,019
PIN 28:0	0,887	0,828	0,863	0,859	1,428	1,408	1,458	1,431
PIN 28:1	0,345	0,308	0,306	0,320	0,476	0,507	0,539	0,507
PIN 28:2	0	0,014	0	0,005	0,022	0,031	0,032	0,028
PIN 30:0	0,192	0,178	0,177	0,182	0,275	0,262	0,258	0,265
PIN 30:1	0,461	0,430	0,452	0,448	0,646	0,647	0,665	0,653
PIN 30:2	0,047	0,050	0,048	0,049	0,068	0,078	0,078	0,075
PIN 31:1	0,108	0,108	0,202	0,139	0,149	0,144	0,214	0,169
PIN 31:2	0	0	0	0	0,013	0	0	0,004
PIN 32:1	3,310	3,276	3,295	3,294	4,190	4,213	4,040	4,148
PIN 32:2	0,801	0,767	0,783	0,783	1,051	1,068	1,051	1,057
PIN 33:1	0,076	0,069	0,078	0,074	0,078	0,075	0,070	0,074
PIN 34:1	7,430	7,235	7,560	7,408	7,161	7,113	6,675	6,983
PIN 34:2	1,758	1,751	1,792	1,767	1,806	1,842	1,732	1,793
PIN 34:3	0	0	0	0	0	0,014	0	0,005
PIN 35:1	0	0,017	0	0,006	0,015	0,015	0	0,010
PIN 36:1	2,028	2,107	2,168	2,101	1,755	1,751	1,550	1,685
PIN 36:2	0,302	0,289	0,306	0,299	0,267	0,260	0,242	0,256
PIN 36:3	0	0,020	0	0,007	0,018	0,018	0	0,012
PS 26:0	0	0	0	0	0,033	0,037	0,039	0,037
PS 28:0	0	0,029	0	0,010	0,046	0,043	0,047	0,045
PS 28:1	0	0	0	0	0	0,018	0	0,006
PS 30:1	0	0,030	0,024	0,018	0,053	0,053	0,046	0,051
PS 31:1	0,019	0,020	0,103	0,047	0,023	0,020	0,022	0,022
PS 32:1	0,455	0,436	0,444	0,445	0,641	0,623	0,604	0,623
PS 32:2	0,081	0,081	0,080	0,081	0,104	0,117	0,119	0,113
PS 33:1	0	0,030	0	0,010	0	0	0	0
PS 34:1	1,299	1,348	1,341	1,329	1,491	1,395	1,280	1,389
PS 34:2	0,531	0,512	0,493	0,512	0,542	0,529	0,506	0,526
PS 36:1	0,050	0,047	0,043	0,046	0,048	0,049	0,048	0,048
PS 36:2	0,042	0,035	0,029	0,035	0,033	0,039	0,033	0,035
TAG 34:0	0	0,058	0	0	0,042	0	0,019	0,014
TAG 36:1	0,063	0,037	0,041	0,057	0,068	0,076	0,047	0,067
TAG 38:0	0	0	0,063	0	0	0	0,021	0
TAG 40:0	0	0	0,078	0,124	0,067	0,118	0,026	0,103
TAG 40:1	0,223	0,193	0,182	0,312	0,327	0,349	0,199	0,329
TAG 40:2	0,116	0,120	0	0,141	0	0	0,079	0,047
TAG 42:1	0,637	0,627	0,586	0,815	0,938	0,955	0,617	0,903
TAG 42:2	0,615	0,652	0,578	0,772	0,852	0,889	0,615	0,837

Tabelle 13: Fortsetzung

Lipid- spezies	KIM01s				KIM01			
	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mittelwert	Replik 1	Replik 2	Replik 3	Mittelwert
TAG 42:3	0	0,025	0	0,061	0,044	0,072	0,008	0,059
TAG 43:1	0	0,034	0	0	0	0	0,011	0
TAG 44:1	0,849	0,835	0,754	0,937	1,041	1,089	0,812	1,023
TAG 44:2	1,096	1,071	0,965	1,166	1,262	1,329	1,044	1,252
TAG 44:3	0,117	0,102	0,097	0,140	0,127	0,143	0,105	0,137
TAG 45:1	0	0	0	0	0	0,092	0	0,031
TAG 45:2	0	0,032	0,038	0,040	0,035	0	0,023	0,025
TAG 46:1	0,509	0,468	0,457	0,519	0,566	0,597	0,478	0,561
TAG 46:2	1,145	1,094	1,008	1,129	1,190	1,192	1,083	1,171
TAG 46:3	0,335	0,301	0,286	0,351	0,360	0,382	0,307	0,364
TAG 47:2	0	0,054	0,061	0,061	0,064	0,084	0,038	0,070
TAG 47:3	0	0,048	0,037	0,047	0,046	0,055	0,028	0,049
TAG 48:1	0	0,263	0,265	0	0,293	0	0,176	0,098
TAG 48:2	2,121	2,001	1,869	1,881	2,033	2,071	1,997	1,995
TAG 48:3	3,229	2,916	2,712	2,960	3,117	3,251	2,952	3,109
TAG 48:4	0	0,024	0	0	0	0,075	0,008	0,025
TAG 49:1	0	0	0	0	0	0,169	0	0,056
TAG 49:2	0,083	0,081	0,089	0,089	0	0	0,085	0,030
TAG 49:3	0,085	0,090	0,073	0,087	0,083	0,103	0,083	0,091
TAG 50:2	3,279	3,048	2,953	2,589	2,793	2,871	3,093	2,751
TAG 50:3	7,237	6,303	6,059	5,567	5,840	6,083	6,533	5,830
TAG 50:4	0	0,068	0,067	0,096	0,084	0,093	0,045	0,091
TAG 51:1	0	0	0,076	0	0	0,212	0,025	0,071
TAG 51:2	0	0,058	0,055	0	0,057	0	0,038	0,019
TAG 51:3	0,076	0,057	0,045	0	0,069	0,062	0,059	0,044
TAG 52:0	0	0	0	0,730	0	0	0	0,243
TAG 52:1	0	0	0,160	0	0	0	0,053	0
TAG 52:2	2,585	2,614	2,638	1,619	1,797	1,830	2,612	1,749
TAG 52:3	4,387	3,880	3,731	3,017	3,201	3,341	3,999	3,186
TAG 52:4	0,058	0,048	0,059	0,067	0,057	0,057	0,055	0,060
TAG 53:1	0	0	0	0	0	0,207	0	0,069
TAG 54:0	0	0	0	0,400	0	0	0	0,133
TAG 54:1	0	0,046	0	0,159	0,058	0,197	0,015	0,138
TAG 54:2	0,653	0,528	0,554	0,416	0,453	0,427	0,579	0,432
TAG 54:3	0,597	0,499	0,543	0,368	0,417	0,433	0,546	0,406
TAG 56:1	0,595	0,070	0,281	0	0,212	0,573	0,315	0,261
TAG 56:2	0	0,039	0	0	0	0	0,013	0
TAG 56:3	0	0,030	0,038	0	0	0	0,023	0
TAG 58:1	0	0	0	0,130	0	0	0	0,043
TAG 58:2	0	0,050	0,062	0,045	0	0	0,037	0,015
TAG 60:2	0	0	0,108	0,057	0	0	0,036	0,019

Tabelle 14 Vollständige Liste aller signifikant de-regulierten DEG in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit K1-Toxin. DEG ($p_{adj.} < 0,05$) wurden anhand ihres \log_2 -Fold Changes in hoch- (grün) und herunterregulierte (rot) DEG klassifiziert. ORF für KIM01 (links) und KIM01s (rechts) sind alphabetisch nach Genname aufgelistet. Gene, die in beiden Stämmen zum entsprechenden Zeitpunkt gleich reguliert wurden sind als Überschneidung (*Intersection*) dargestellt. DEG, die in einer analog durchgeführten Transkriptomanalyse ebenfalls in BY4742 signifikant de-reguliert vorlagen, sind in fetter Schrift hervorgehoben (Gier *et al.*, 2019a).

Tabelle 14-a: Liste aller signifikant hochregulierten DEG in KIM01 und KIM01s nach 5 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,05$). U. F.: *Unknown Function*.

KIM01		INTERSECTION		KIM01s			
ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME
YKL178C	STE3	YAR015W	ADE1	YGL234W	ADE5,7	YFR053C	HXK1
		YLR359W	ADE13	YGR061C	ADE6	YDR497C	ITR1
		YMR120C	ADE17	YDR085C	AFR1	YPL004C	LSP1
		YOR128C	ADE2	YHL021C	AIM17	YBR298C	MAL31
		YBR203W	COS111	YOR374W	ALD4	YDR001C	NTH1
		YKR075W-A	Dubious ORF	YOR028C	CIN5	YMR105C	PGM2
		YMR136W	GAT2	YIL169C	CSS1	YER053C	PIC2
		YFR015C	GSY1	YGR088W	CTT1	YEL060C	PRB1
		YKL109W	HAP4	YML054C	CYB2	YOL103W-B	Retrotransposon
		YMR011W	HXT2	YER067C-A	Dubious ORF	YER067W	RGI1
		YDR345C	HXT3	YFR052C-A	Dubious ORF	YML091C	RPM2
		YHR092C	HXT4	YMR031C	EIS1	YDR077W	SED1
		YDR342C	HXT7	YDR516C	EMI2	YER081W	SER3
		YKL062W	MSN4	YMR124W	EPO1	YMR291W	TDA1
		YKR080W	MTD1	YLR342W	FKS1	YBR083W	TEC1
		YDR277C	MTH1	YMR250W	GAD1	YOR052C	TMC1
		YLR058C	SHM2	YDR096W	GIS1	YOR273C	TPO4
		YKR075C	U. F.	YEL011W	GLC3	YBR126C	TPS1
				YKR058W	GLG1	YDR074W	TPS2
				YCL040W	GLK1	YML100W	TSL1
				YPR160W	GPH1	YNL144C	U. F.
				YKR067W	GPT2	YIL101C	XBP1
				YIL155C	GUT2	YJL141C	YAK1
				YOL155C	HPF1	YMR104C	YPK2
				YLL026W	HSP104		
1		18		49			

Tabelle 14-b: Liste aller signifikant hochregulierten DEG in KIM01 und KIM01s nach 45 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,05$). U. F.: *Unknown Function*.

KIM01		INTERSECTION		KIM01s			
ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME
YDR019C	GCV1	YAR015W	ADE1	YGR204W	ADE3	YGR055W	MUP1
YMR189W	GCV2	YNL220W	ADE12	YGR061C	ADE6	YHL036W	MUP3
YPL060C-A	TyA Gag	YLR359W	ADE13	YDR216W	ADR1	YBR212W	NGR1
YDR019C	GCV1	YMR120C	ADE17	YLR109W	AHP1	YHR097C	PAL2
		YOR128C	ADE2	YPL061W	ALD6	YMR105C	PGM2
		YMR300C	ADE4	YOR028C	CIN5	YGL037C	PNC1
		YGL234W	ADE5,7	YGR088W	CTT1	YNL279W	PRM1
		YNR044W	AGA1	YML054C	CYB2	YML047C	PRM6
		YOR374W	ALD4	YPL265W	DIP5	YIL080W	Pseudogene
		YFR052C-A	Dubious ORF	YKL177W	Dubious ORF	YPR115W	RGC1
		YCR089W	FIG2	YMR031C	EIS1	YJR004C	SAG1
		YPR160W	GPH1	YDR516C	EMI2	YLR180W	SAM1
		YIL155C	GUT2	YOL158C	ENB1	YDR077W	SED1
		YFR053C	HXK1	YJL157C	FAR1	YER081W	SER3
		YMR011W	HXT2	YMR058W	FET3	YIL074C	SER33
		YHR092C	HXT4	YBR040W	FIG1	YEL065W	SIT1
		YDR342C	HXT7	YER145C	FTR1	YJR045C	SSC1
		YLR303W	MET17	YCL027W	FUS1	YHR084W	STE12
		YER091C	MET6	YMR232W	FUS2	YKL178C	STE3
		YLL062C	MHT1	YMR250W	GAD1	YGR008C	STF2
		YKR080W	MTD1	YEL011W	GLC3	YCR030C	SYP1
		YNL036W	NCE103	YCL040W	GLK1	YBR083W	TEC1
		YLR180W	SAM1	YFR015C	GSY1	YBR126C	TPS1
		YDR502C	SAM2	YKL109W	HAP4	YDR074W	TPS2
		YLR058C	SHM2	YLR205C	HMX1	YML100W	TSL1
		YLR327C	TMA10	YPL240C	HSP82	YLL039C	UBI4
				YCL055W	KAR4	YKL035W	UGP1
				YGR244C	LSC2	YGR130C	U. F.
				YPL004C	LSP1	YMR196W	U. F.
				YIL070C	MAM33	YGR065C	VHT1
				YFR030W	MET10	YHL035C	VMR1
				YJR137C	MET5	YDR089W	VTC5
				YLL061W	MMP1	YIL101C	XBP1
				YML128C	MSC1	YNL160W	YGP1
				YDR277C	MTH1	YGR109W-B	YGR109W-B
4		25		71			

Tabelle 14-c: Liste aller signifikant herunterregulierten DEG in KIM01 und KIM01s nach 5 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,05$).

KIM01		INTERSECTION		KIM01s	
ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME
YPL061W	ALD6	YCR005C	CIT1	YLR154W-A	Dubious ORF
YDL023C	Dubious ORF	YDL022W	GPD1	YLR154W-B	Dubious ORF
YIL053W	GPP1	YHR094C	HXT1	YLR154W-C	Dubious ORF
YFR032C-A	RPL29	YPR036W-A	SPO24	YLR154W-F	Dubious ORF
YDR536W	STL1			YDL133C-A	RPL41B
YHR033W	U. F.			YDR222W	U. F.
YLL067C	YLL067C				
YPL061W	ALD6				
YDL023C	Dubious ORF				
9		4		6	

Tabelle 14-d: Liste aller signifikant herunterregulierten DEG in KIM01 und KIM01s nach 45 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,05$).

KIM01		INTERSECTION		KIM01s	
ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME
YOL086C	ADH1	YJL088W	ARG3	YBR158W	AMN1
YOL058W	ARG1	YER069W	ARG5,6	YOL140W	ARG8
YAL037C-B	Dubious ORF	YOR303W	CPA1	YGL157W	ARI1
YDL023C	Dubious ORF	YHR183W	GND1	YJR109C	CPA2
YHL002C-A	Dubious ORF	YDL022W	GPD1	YGR189C	CRH1
YHR174W	ENO2	YIL053W	GPP1	YCR013C	Dubious ORF
YER062C	GPP2	YHR094C	HXT1	YKL153W	Dubious ORF
YLR432W	IMD3	YHR216W	IMD2	YLR300W	EXG1
YDL182W	LYS20	YIR034C	LYS1	YIL116W	HIS5
YLR044C	PDC1	YDR033W	MRH1	YBL002W	HTB2
YPL058C	PDR12	YJR009C	TDH2	YDR345C	HXT3
YOL143C	RIB4			YML056C	IMD4
YHR087W	RTC3			YDL003W	MCD1
YLL024C	SSA2			YDR055W	PST1
YDR536W	STL1			YER070W	RNR1
				YDR222W	U. F.
				YKL216W	URA1
				YMR241W	YHM2
				YBR054W	YRO2
15		11		19	

Tabelle 15: Auflistung der signifikant de-regulierten ORF nach paarweise vergleichender Analyse. DEG ($p_{adj.} < 0,05$) wurden anhand ihres \log_2 -Fold Changes in hoch- (grün) und herunterregulierte (rot) ORF klassifiziert. In alphabetischer Reihenfolge (nach Genname) sind die DEG mit zugehörigen \log_2 -Fold Change aufgelistet, die in der Killerhefe KIM01 basal (ohne K1-Applikation) signifikant hoch- bzw. herunterreguliert vorlagen.

Tabelle 15-a: Liste der signifikant hochregulierten DEG in KIM01 im Vergleich zu KIM01s vor Zugabe des K1-Toxins (Basal), ($p_{adj.} < 0,05$).

ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE	ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE
YER045C	ACA1	0,7	YFL014W	HSP12	1,6
YAR015W	ADE1	1,0	YDR171W	HSP42	0,6
YNL220W	ADE12	0,4	YDL245C	HXT15	0,9
YLR359W	ADE13	0,6	YDR342C	HXT7	0,4
YMR120C	ADE17	2,3	YJL219W	HXT9	2,7
YOR128C	ADE2	0,8	YER062C	GPP2	0,3
YMR300C	ADE4	0,4	YPL223C	GRE1	2,0
YGL234W	ADE5,7	0,6	YFR015C	GSY1	0,6
YGR061C	ADE6	0,5	YDL223C	HBT1	0,8
YDR216W	ADR1	0,4	YCL030C	HIS4	0,5
YNR044W	AGA1	1,2	YLR355C	ILV5	0,2
YLR109W	AHP1	0,4	YCL055W	KAR4	0,5
YHL021C	AIM17	0,6	YCL018W	LEU2	0,5
YMR169C	ALD3	0,7	YOL126C	MDH2	0,6
YKL103C	APE1	0,4	YML128C	MSC1	0,6
YOL058W	ARG1	0,3	YMR037C	MSN2	0,3
YHR018C	ARG4	0,3	YKR080W	MTD1	1,5
YDR380W	ARO10	0,7	YJL116C	NCA3	0,9
YDR421W	ARO80	0,5	YOL104C	NDJ1	1,2
YHR137W	ARO9	0,4	YBR212W	NGR1	0,3
YML116W	ATR1	0,5	YGL038C	OCH1	0,4
YJR148W	BAT2	0,6	YDR406W	PDR15	0,7
YAL060W	BDH1	0,6	YOR153W	PDR5	1,0
YAL061W	BDH2	0,8	YNL279W	PRM1	1,1
YFR047C	BNA6	0,4	YIL117C	PRM5	1,0
YLR267W	BOP2	0,6	YML047C	PRM6	2,2
YCL064C	CHA1	1,1	YOR157C	PUP1	0,3
YJL158C	CIS3	0,4	YOR348C	PUT4	1,0
YML071C	COG8	0,3	YGL062W	PYC1	0,4
YGR088W	CTT1	0,9	YCL028W	RNQ1	0,3
YKL096W-A	CWP2	0,4	YFR032C-A	RPL29	0,6
YMR173W	DDR48	0,6	YLR185W	RPL37a	0,3
YER088C	DOT6	0,5	YFR032C	RRT5	1,4
YBL101C	ECM21	1,2	YHR087W	RTC3	1,2
YMR031C	EIS1	0,3	YDL204W	RTN2	0,7
YDR153C	ENT5	0,5	YJR004C	SAG1	0,3
YBR040W	FIG1	2,4	YDR077W	SED1	0,4
YCR089W	FIG2	1,2	YOR184W	SER1	0,4
YAL063C	FLO9	0,6	YER081W	SER3	0,5
YCL027W	FUS1	0,8	YLR058C	SHM2	1,8
YMR232W	FUS2	1,6	YML066C	SMA2	0,9
YMR250W	GAD1	0,7	YOL122C	SMF1	0,4
YDR019C	GCV1	1,4	YMR096W	SNZ1	1,3
YMR189W	GCV2	1,9	YAL005C	SSA1	0,5
YAL044C	GCV3	1,0	YPL092W	SSU1	0,9
YOR120W	GCY1	0,5	YDL130W-A	STF1	0,7
YPR184W	GDB1	0,6	YGR008C	STF2	0,6
YER040W	GLN3	0,4	YJL052W	TDH1	1,0
YGR256W	GND2	1,2	YLR237W	THI7	0,5
YNL274C	GOR1	0,5	YER011W	TIR1	1,5

Tabelle 15-a: Fortsetzung

ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE	ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE
YOR045W	TOM6	0,5	YML100W	TSL1	1,2
YBR162C	TOS1	0,3	YLL039C	UBI4	0,5
YGL186C	TPN1	0,4	YKL035W	UGP1	0,3
YBR126C	TPS1	0,3	YBL005W-B	Uncharacterized	0,7
YDR074W	TPS2	0,5	YBL111C	Uncharacterized	8,9
YFL014W	Uncharacterized	1,1	YPR158C-D	Uncharacterized	0,9
YDR171W	Uncharacterized	0,7	YPR202W	Uncharacterized	0,9
YDL245C	Uncharacterized	0,7	YPR204W	Uncharacterized	0,8
YDR342C	Uncharacterized	0,8	YEL021W	URA3	0,3
YJL219W	Uncharacterized	6,0	YKR042W	UTH1	0,3
YLR355C	Uncharacterized	2,4	YER064C	VHR2	0,3
YCL055W	Uncharacterized	1,1	YNL160W	YGP1	0,8
YCL018W	Uncharacterized	1,0	YDR545W	YRF1-1	1,3
YOL126C	Uncharacterized	0,5	YLR466W	YRF1-4	0,8
YML128C	Uncharacterized	1,1	YLR467W	YRF1-5	1,3
YMR037C	Uncharacterized	0,7	YNL339C	YRF1-6	1,4
YKR080W	Uncharacterized	3,6	YOR396W	YRF1-8	1,3
YJL116C	Uncharacterized	1,6	YBR148W	YSW1	1,4
YOL104C	Uncharacterized	1,4	YGL255W	ZRT1	0,4
YBR212W	Uncharacterized	0,7	YER190C-A	YER190C-A	0,9
YGL038C	Uncharacterized	0,8	YGR296C-A	YGR296C-A	0,9
YDR406W	Uncharacterized	1,4	YHR052W-A	YHR052W-A	0,7
YOR153W	Uncharacterized	0,7	YHR054W-A	YHR054W-A	0,7
YNL279W	Uncharacterized	1,0	YHR218W-A	YHR218W-A	1,1
YIL117C	Uncharacterized	0,8	YHR219C-A	YHR219C-A	8,3
YML047C	Uncharacterized	0,8	YLL066W-A	YLL066W-A	1,0
YOR157C	Uncharacterized	2,0	YLL067W-A	YLL067W-A	1,0
YOR348C	Uncharacterized	0,8	YML133W-A	YML133W-A	0,9
YGL062W	Uncharacterized	0,6	YML133W-B	YML133W-B	8,3
YCL028W	Uncharacterized	0,5	YMR307C-A	YMR307C-A	0,8
YFR032C-A	Uncharacterized	0,8	YNL339W-A	YNL339W-A	0,9
YLR185W	Uncharacterized	0,3	YNL339W-B	YNL339W-B	8,3
YFR032C	Uncharacterized	0,4	YPL283W-A	YPL283W-A	0,9
YHR087W	Uncharacterized	12,7			

Tabelle 15-b: Liste der signifikant herunterregulierten DEG in KIM01 im Vergleich zu KIM01s vor Zugabe des K1-Toxins (Basal), ($p_{adj.} < 0,05$).

ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE	ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE
YHR047C	AAPI	0,4	YOR316C	COT1	0,4
YJL200C	ACO2	0,4	YER141W	COX15	0,4
YLR153C	ACS2	0,3	YLR395C	COX8	0,4
YOR374W	ALD4	0,4	YOR303W	CPA1	0,3
YBR158W	AMN1	0,2	YBR291C	CTP1	0,4
YNR019W	ARE2	0,5	YGR155W	CYS4	0,2
YJL088W	ARG3	0,3	YOR065W	CYT1	0,3
YDR101C	ARX1	0,2	YNL112W	DBP2	0,2
YNL315C	ATP11	0,3	YLR129W	DIP2	0,3
YDR046C	BAP3	0,4	YPL265W	DIP5	0,6
YDR299W	BFR2	0,3	YNR067C	DSE4	0,5
YOL077C	BRX1	0,3	YPL095C	EEB1	1,0
YPL048W	CAM1	0,3	YHL039W	EFM1	0,3
YIL043C	CBR1	0,3	YDR036C	EHD3	0,3
YMR038C	CCS1	0,3	YLR372W	ELO3	0,2
YOR356W	CIR2	0,3	YHR007C	ERG11	0,3
YBL045C	COR1	0,2	YMR202W	ERG2	0,3
YGR295C	COS6	0,4	YER044C	ERG28	0,4

Tabelle 15-b: Fortsetzung

ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE	ORF	GENE NAME	LOG2 FOLD CHANGE
YOR051C	ETT1	0,2	YDR465C	RMT2	0,3
YOR317W	FAA1	0,4	YJL026W	RNR2	0,4
YHR049W	FSH1	0,3	YGR180C	RNR4	0,3
YEL009C	GCN4	0,2	YNL248C	RPA49	0,2
YPR035W	GLN1	0,2	YHR088W	RPF1	0,3
YDR454C	GUK1	0,3	YJL191W	RPS14b	0,7
YDL205C	HEM3	0,3	YGL123W	RPS2	0,2
YMR186W	HSC82	0,2	YLR367W	RPS22b	1,0
YFR053C	HXK1	0,4	YPL081W	RPS9a	0,7
YGL253W	HXK2	0,3	YIL093C	RSM25	0,4
YHR092C	HXT4	0,7	YDR502C	SAM2	0,3
YCL009C	ILV6	0,4	YPL274W	SAM3	0,4
YML056C	IMD4	0,2	YGR049W	SCM4	0,4
YNL182C	IPI3	0,3	YMR272C	SCS7	0,3
YIL094C	LYS12	0,3	YDL063C	SYO1	0,3
YDR234W	LYS4	0,3	YPR041W	TIF5	0,2
YNR050C	LYS9	0,2	YHR005C-A	TIM10	0,3
YBR142W	MAK5	0,2	YNR017W	TIM23	0,3
YOR298C-A	MBF1	0,2	YNL121C	TOM70	0,2
YLR069C	MEF1	0,3	YGR138C	TPO2	0,5
YKL001C	MET14	0,5	YOR187W	TUF1	0,2
YLR303W	MET17	0,3	YCR024C-B	Uncharacterized	0,3
YPL187W	MF(ALPHA)1	0,4	YCR087C-A	Uncharacterized	0,8
YLL062C	MHT1	0,6	YDR098C-B	Uncharacterized	2,3
YLL061W	MMP1	0,7	YDR210W-B	Uncharacterized	5,2
YMR024W	MRPL3	0,3	YDR341C	Uncharacterized	0,2
YHR039C	MSC7	0,4	YDR365W-B	Uncharacterized	1,4
YDR194C	MSS116	0,3	YGR038C-B	Uncharacterized	1,8
YDR277C	MTH1	0,4	YHL044W	Uncharacterized	0,8
YMR145C	NDE1	0,3	YIR035C	Uncharacterized	0,6
YHR170W	NMD3	0,2	YJR027W	Uncharacterized	1,7
YNL061W	NOP2	0,3	YKL153W	Uncharacterized	0,5
YGR103W	NOP7	0,3	YML131W	Uncharacterized	0,6
YOR209C	NPT1	0,3	YNL054W-B	Uncharacterized	1,6
YOR222W	ODC2	0,3	YNL217W	Uncharacterized	0,4
YML060W	OGG1	0,4	YOR192C-B	Uncharacterized	0,7
YJL212C	OPT1	0,3	YOR309C	Uncharacterized	0,6
YBL030C	PET9	0,2	YPR158C-C	Uncharacterized	4,3
YPR113W	PIS1	0,3	YLR420W	URA4	0,3
YOR361C	PRT1	0,2	YML106W	URA5	0,3
YDR055W	PST1	0,4	YMR093W	UTP15	0,3
YDR496C	PUF6	0,3	YDR324C	UTP4	0,3
YHR037W	PUT2	0,4	YHR196W	UTP9	0,3
YPR191W	QCR2	0,3	YOR230W	WTM1	0,5
YDR529C	QCR7	0,3	YJL026C-A	YJL026C-A	0,7
YPL246C	RBD2	0,4	YBR183W	YPC1	0,5
YBR073W	RDH54	0,3	YDR381W	YRA1	0,3
YOL080C	REX4	0,5	YBR054W	YRO2	0,4
YHR197W	RIX1	0,4	YGR211W	ZPR1	0,3
YLR009W	RLP24	0,3			

Tabelle 16: Auflistung der signifikant de-regulierten ORF nach paarweise vergleichender Analyse. DEG ($p_{adj.} < 0,05$) wurden anhand ihres \log_2 -Fold Changes in hoch- (grün) und herunterreguliert (rot) eingeteilt. In alphabetischer Reihenfolge (nach Gencode) aufgelistet sind die ORF, die in der Killerhefe KIM01 zum entsprechenden Zeitpunkt (t_5) und (t_{45}) signifikant hoch- bzw. herunterreguliert vorlagen. Gene, die zu beiden Zeitpunkten gleich reguliert wurden, sind als Überschneidung (Intersection) dargestellt.

Tabelle 16-a: Liste der signifikant hochregulierten DEG in KIM01 im Vergleich zu KIM01s nach 5 min (t_5 , links) und 45 min (t_{45} , rechts) Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,05$). *: Helicase-like protein **: Putative Y' element ATP-dependent helicase

t5		INTERSECTION		t45	
ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME
YLR109W	AHP1	YAR015W	ADE1	YMR300C	ADE4
YOL058W	ARG1	YNL220W	ADE12	YGR061C	ADE6
YML116W	ATR1	YLR359W	ADE13	YJR148W	BAT2
YMR173W-A	Dubious ORF	YMR120C	ADE17	YAL060W	BDH1
YCR089W	FIG2	YOR128C	ADE2	YJR109C	CPA2
YCL030C	HIS4	YGL234W	ADE5,7	YDR019C	GCV1
YJL116C	NCA3	YDR380W	ARO10	YHR218W	*
YGL038C	OCH1	YCL064C	CHA1	YIL116W	HIS5
YNL149C	PGA2	YMR173W	DDR48	YMR122W-A	NCW1
YGR079W	Putative Protein	YPR204W	DNA Helicase	YOR153W	PDR5
YDR034C-D	Retrotransposon	YBL101C	ECM21	YFL068W	Putative Protein
YJR029W	Retrotransposon	YMR189W	GCV2	YML133C	**
YMR046C	Retrotransposon	YAL044C	GCV3	YLL067C	**
YOR343W-B	Retrotransposon	YBL113C	*	YCL019W	Retrotransposon
YFR032C-A	RPL29	YFL014W	HSP12	YDR316W-A	Retrotransposon
YDL133C-A	RPL41B	YKR080W	MTD1	YFL002W-A	Retrotransposon
YDR222W	U. F.	YAR066W	Putative Protein	YGR161C-C	Retrotransposon
YLR042C	U. F.	YBL112C	Putative Protein	YGR161W-B	Retrotransposon
YNL160W	YGP1	YHR054C	Putative Protein	YLR410W-B	Retrotransposon
YLR466W	YRF1-4	YHR219W	Putative Protein	YPR137C-B	Retrotransposon
		YBL005W-B	Retrotransposon	YPL092W	SSU1
		YHR214C-B	Retrotransposon	YGR296W	YRF1-3
		YMR045C	Retrotransposon	YNL339C	YRF1-6
		YPR137C-B	Retrotransposon	YPL283C	YRF1-7
		YPR158C-D	Retrotransposon		
		YOR184W	SER1		
		YLR058C	SHM2		
		YMR096W	SNZ1		
		YER011W	TIR1		
		YDR545W	YRF1-1		
		YLR467W	YRF1-5		
		YOR396W	YRF1-8		
		YOL109W	ZEO1		
20		33		24	

Tabelle 16-b: Liste der signifikant herunterregulierten DEG in KIM01 im Vergleich zu KIM01s nach 5 min (t_5 , links) und 45 min (t_{45} , rechts) Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,05$).

t5		INTERSECTION		t45	
ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME	ORF	GENE NAME
YLR153C	ACS2	YOR374W	ALD4	YBR149W	ARA1
YOL086C	ADH1	YPL061W	ALD6	YJL088W	ARG3
YNR019W	ARE2	YML054C	CYB2	YLR390W-A	CCW14
YJR121W	ATP2	YOR065W	CYT1	YKL096W	CWP1
YJL020C	BBC1	YPL265W	DIP5	YDR258C	HSP78
YLL018C	DPS1	YLR154W-E	Dubious ORF	YLR413W	INA1
YDR433W	Dubious ORF	YJL159W	HSP150	YIL094C	LYS12
YHR007C	ERG11	YFR053C	HXK1	YFR030W	MET10
YOR317W	FAA1	YHR092C	HXT4	YLR303W	MET17
YPL231W	FAS2	YDR098C-B	Retrotransposon	YJR137C	MET5
YEL011W	GLC3	YDR210W-B	Retrotransposon	YLL061W	MMP1
YCL040W	GLK1	YDR365W-B	Retrotransposon	YJL079C	PRY1
YFR015C	GSY1	YGR038C-B	Retrotransposon	YAR010C	Retrotransposon
YKL109W	HAP4	YJR027W	Retrotransposon	YDR316W-B	Retrotransposon
YLL026W	HSP104	YBR079C	RPG1	YPR137C-A	Retrotransposon
YMR011W	HXT2	YLR367W	RPS22B	YJL191W	RPS14B
YDR342C	HXT7	YPL081W	RPS9A	YNL007C	SIS1
YCL009C	ILV6	YDR502C	SAM2	YOR230W	WTM1
YBR298C	MAL31	YMR272C	SCS7		
YDR277C	MTH1	YLL024C	SSA2		
YHR042W	NCP1	YOR027W	STI1		
YMR145C	NDE1	YML072C	TCB3		
YDL014W	NOPI	YNL054W-B	TyB Gag-Pol Protein		
YDR432W	NPL3				
YCL043C	PDII				
YBL030C	PET9				
YMR205C	PFK2				
YDL095W	PMT1				
YJL078C	PRY3				
YDR524W-C	Putative Protein				
YBR218C	PYC2				
YLR106C	REA1				
YER160C	Retrotransposon				
YGR161C-D	Retrotransposon				
YJL225C	Retrotransposon				
YML045W	Retrotransposon				
YOR192C-B	Retrotransposon				
YPR158C-C	Retrotransposon				
YFL036W	RPO41				
YKL148C	SDH1				
YOR273C	TPO4				
YDR074W	TPS2				
42		23		18	

Tabelle 17: Vollständige Liste der GO-Terme nach *Enrichment* mittels *Gorilla* (*Biological Process*). DEG ($p_{adj.} < 0,05$) wurden anhand ihres \log_2 -Fold Changes in hoch- (grün) und herunterreguliert (rot) sortiert. Dargestellt sind die GO-Terme, die nach Clustering über *Revigo* signifikant angereichert wurden (FDR- $p < 0,01$, *Cut-Off* < 10) mit zugehörigem *Fold Enrichment* (F. E.) und den Genen, die sie umfassen. F. E. wurde automatisch berechnet. AA: *Amino Acid*, BP: *Biological Process*, CP: *Catabolic Process*, IMP: *Inosine Monophosphate*; MP: *Metabolic Process*, TMT: *Transmembrane Transport*

Tabelle 17-a: Liste der signifikant hochregulierten GO-Terme nach 5 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,01$).

GO-TERM	BESCHREIBUNG	FDR p	F. E.	GENES
GO:0046040	IMP MP	2.64E-6	53,4	ADE2, ADE1, ADE17, ADE5,7, ADE13, ADE12
GO:0015074	DNA Integration	1.05E-5	18,9	YDR034C-D, YMR045C, YPR137C-B, YBL005W-B, YOR343W-B, YHR214C-B, YJR029W, YPR158C-D
GO:0032197	Transposition, RNA-Mediated	7.42E-5	11,2	YDR034C-D, YMR045C, YPR137C-B, YBL005W-B, YMR046C, YOR343W-B, YHR214C-B, YJR029W, YPR158C-D
GO:0006278	RNA-Dependent DNA BP	7.18E-5	13,2	YDR034C-D, YMR045C, YPR137C-B, YBL005W-B, YOR343W-B, YHR214C-B, YJR029W, YPR158C-D
GO:0032196	Transposition	7.13E-5	10,5	YDR034C-D, YMR045C, YBL005W-B, YPR137C-B, YMR046C, YOR343W-B, YJR029W, YHR214C-B, YPR158C-D
GO:0006730	One-Carbon MP	2.8E-3	25,7	MTD1, GCV3, GCV2, SHM2
GO:0009069	Serine Family AA MP	3.95E-3	14,1	GCV3, CHA1, GCV2, SHM2, SER1

Tabelle 17-b: Liste der signifikant hochregulierten GO-Terme nach 45 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,01$).

GO-TERM	BESCHREIBUNG	FDR p	F. E.	GENES
GO:0046040	IMP MP	1.59E-10	68,5	ADE4, ADE2, ADE1, ADE17, ADE5,7, ADE13, ADE6, ADE12
GO:0015074	DNA Integration	3.81E-7	20,4	YCL019W, YMR045C, YPR137C-B, YBL005W-B, YFL002W-A, YGR161W-B, YHR214C-B, YLR410W-B, YPR158C
GO:0032197	Transposition, RNA-Mediated	3.74E-7	13,2	YDR316W-A, YCL019W, YMR045C, YPR137C-B, YBL005W-B, YFL002W-A, YGR161C-C, YGR161W-B, YHR214C-B, YLR410W-B, YPR158C-D
GO:0032196	Transposition	6.2E-7	12,4	YDR316W-A, YCL019W, YMR045C, YBL005W-B, YPR137C-B, YFL002W-A, YGR161C-C, YGR161W-B, YHR214C-B, YLR410W-B, YPR158C-D
GO:0009071	Serine Family AA CP	3.88E-6	61,8	GCV1, GCV3, CHA1, GCV2
GO:0006278	RNA-Dependent DNA BP	4.19E-6	14,3	YCL019W, YMR045C, YPR137C-B, YBL005W-B, YFL002W-A, YGR161W-B, YHR214C-B, YLR410W-B, YPR158C-D
GO:0006730	One-Carbon MP	9.46E-5	30,9	MTD1, GCV1, GCV3, GCV2, SHM2
GO:0032508	DNA Duplex Unwinding	1.6E-3	10,8	YRF1-8, YRF1-7, YRF1-6, YLL067C, YPR204W, YML133C
GO:0001505	Regulation Neurotransmitter Levels	1.95E-3	23,4	GCV1, GCV3, GCV2, SHM2
GO:0042135	Neurotransmitter CP	3.37E-3	41,7	GCV1, GCV3, GCV2
GO:0042440	Pigment MP	9.91E-3	14,8	ADE4, MTD1, ADE5,7, SER1

Tabelle 17-c: Liste der signifikant herunterregulierten GO-Terme nach 5 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,01$).

GO-TERM	BESCHREIBUNG	FDR p	F. E.	GENES
GO:0006278	RNA-Dependent DNA BP	5.95E-6	13,3	YGR038C-B, YER160C, YDR365W-B, YJR027W, YNL054W-B, YGR161C-D, YOR192C-B, YML045W, YDR098C-B, YDR210W-B
GO:0032197	Transposition, RNA-Mediated	4.6E-6	11,0	YGR038C-B, YER160C, YDR365W-B, YJR027W, YNL054W-B, YGR161C-D, YOR192C-B, YML045W, YDR098C-B, YDR210W-B, YPR158C-C
GO:0032196	Transposition	6.8E-6	10,4	YGR038C-B, YER160C, YDR365W-B, YJR027W, YNL054W-B, YOR192C-B, YGR161C-D, YML045W, YDR098C-B, YDR210W-B, YPR158C-C
GO:0034219	Carbohydrate TMT	2.59E-5	21,1	HXT4, HXK1, GLK1, HXT7, MTH1, MAL31, HXT2
GO:1904659	Glucose TMT	4.96E-5	26,7	HXT4, HXK1, GLK1, HXT7, MTH1, HXT2
GO:0017000	Antibiotic BP	3.54E-3	46,7	ALD4, ALD6, ADH1
GO:0006006	Glucose MP	5.97E-3	12,0	PYC2, NDE1, HXK1, GLK1, PFK2
GO:0006083	Acetate MP	6.65E-3	35,0	ACS2, ALD4, ALD6

Tabelle 17-d: Liste der signifikant herunterregulierten GO-Terme nach 5 min Inkubation mit K1-Toxin ($p_{adj.} < 0,01$).

GO-TERM	BESCHREIBUNG	FDR p	F. E.	GENES
GO:0032197	Transposition, RNA-Mediated	4.62E-5	14,0	YGR038C-B, YDR316W-B, YAR010C, YDR365W-B, YJR027W, YNL054W-B, YPR137C-A, YDR098C-B, YDR210W-B
GO:0032196	Transposition	4.03E-5	13,2	YGR038C-B, YDR316W-B, YAR010C, YDR365W-B, YJR027W, YNL054W-B, YPR137C-A, YDR098C-B, YDR210W-B
GO:0015074	DNA Integration	5.3E-5	20,7	YGR038C-B, YDR316W-B, YDR365W-B, YNL054W-B, YJR027W, YDR098C-B, YDR210W-B
GO:0006278	RNA-Dependent DNA BP	4.99E-4	14,5	YGR038C-B, YDR316W-B, YDR365W-B, YJR027W, YNL054W-B, YDR098C-B, YDR210W-B
GO:0071897	DNA BP	4.00E-3	10,3	YGR038C-B, YDR316W-B, YDR365W-B, YJR027W, YNL054W-B, YDR098C-B, YDR210W-B

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Manfred J. Schmitt für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl. Besonders bedanken möchte ich mich für die Freiheit in der Gestaltung dieses interessanten und abwechslungsreichen Themas und das gesetzte Vertrauen in die einzelnen Projekte.

Prof. Dr. Martin Simon möchte ich nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens danken, sondern auch für die unschätzbare Hilfe in der Planung bzw. Gestaltung der RNA-Seq-Experimente und die generelle stetige Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Rolf Müller danke ich herzlich für die Übernahme der wissenschaftlichen Begleitung dieser Promotion sowie den hilfreichen Input. Mein Dank gilt außerdem allen Kooperationspartnern, die viele Projekte in ihrer Durchführung erst ermöglicht haben. Dr. Gilles Gasparoni und Dr. Karl Nordström möchte ich für die Durchführung bzw. Daten-Aquisition der Illumina-Sequenzierung, Prof. Dr. Marcel Schulz für die Unterstützung bei der bioinformatischen Auswertung der Daten danken. Prof. Dr. Andreas Tholey und Dr. Christian Treitz danke ich für ihren Einsatz und die Diskussionsbereitschaft hinsichtlich der Analyse der Disulfidbrücken des Toxins.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der Molekular- und Zellbiologie möchte ich mich für die schönen Jahre und das unvergleichliche Arbeitsklima bedanken, langweilig wurde es selten. Zudem möchte ich all meinen ehemaligen Bachelor-, Lehramts- und Masterstudenten danken, die mit ihren Bemühungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Frank Breinig für alle die aufbauenden Worte und die Portion „rationalen Optimismus“ in meinem Arbeitsleben sowie den besten Arbeitskollegen Dr. Ruth Kiefer und Dr. Andrea Blum für all ihre Unterstützung während der letzten Jahre, ob im Labor oder darüber hinaus.

Franziska Drews und Marcello Pirritano möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft in der Planung und Durchführung der Illumina-Sequenzierung und natürlich auch für die vielen unterhaltsamen Samstage danken. Ein herzlicher Dank gilt insbesondere Andrea Blum und Nathalie Jung für die unzähligen schönen Erinnerungen, die nicht nur die Zeit der Promotion sondern bereits das Studium unvergesslich gemacht haben. Tamira Donie möchte ich für das Ertragen, Verstehen und gelegentliche Unterstützen diverser Gewitterwolken über all die Jahre danken. Mein größter Dank gilt meinen Eltern Petra und Herbert, meiner Schwester Annika sowie meinen Großeltern, ohne deren Unterstützung und Rückhalt mein Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären.

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Nutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, 2019

(Stefanie Gier)