

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2003 bis Mai 2007 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen und im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: _____

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. H.-U. Mösch
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. M. Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Brückner S., Köhler T., Braus G., Heise B., Bolte M., Mösch H.-U. (2004). Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Curr. Genet.* 46: 331–42.

In Bearbeitung:

Brückner S., Kern S., Mösch H.-U. (2007). Control of yeast Tec1 protein stability by nutrients and the TOR pathway depends on the ubiquitin ligase Rsp5.

Weitere wissenschaftliche Beiträge:

Braus G., Grundmann O., Brückner S., Mösch H.-U. (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14: 4272–84.

Spiliotis M., Tappe D., Brückner S., Mösch H.-U., Brehm K. (2005). Molecular cloning and characterization of Ras- and Raf-homologues from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139: 225-37.

Spiliotis M., Konrad C., Gelmedin V., Tappe D., Brückner S., Mösch H.-U., Brehm K. (2006). Characterisation of EmMPK1, an ERK-like MAP kinase from *Echinococcus multilocularis* which is activated in response to human epidermal growth factor. *Int. J. Parasitol.* 36: 1097-1112.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel "Regulation des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors Tec1 durch die Pheromon-induzierte MAPK-Kaskade und den TOR-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae*" selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort / Datum)

(Stefan Brückner)

The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not “Heureka!” but “That’s funny ...!”

- Isaac Asimov -

Zusammenfassung

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein dimorpher Pilz, der abhängig von den Umweltbedingungen verschiedene Wachstumsformen annehmen kann. So ermöglicht ein gutes Nährstoffangebot haploiden Hefezellen die sexuelle Konjugation mit Partnerzellen zur Ausbildung des diploiden Zellstadiums. Bestimmte Nährstoffmangelbedingungen hingegen verhindern die Konjugation und fördern eine adhäsive Wachstumsform, bei der Hefezellen des gleichen Geschlechts Biofilme ausbilden und an Oberflächen haften. Die Ausführung dieser beiden unterschiedlichen Entwicklungsprogramme wird von einem konservierten MAPK-Modul gesteuert, in dessen Zentrum die MAPK Fus3 und Kss1 und die Transkriptionsfaktoren Ste12 und Tec1 wirken. Akuter Nährstoffmangel schließlich induziert den Eintritt in die stationäre Phase und wird durch das komplexe TOR-Signalnetzwerk reguliert.

Das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit galt dem Transkriptionsfaktor Tec1, dem einzigen Vertreter der konservierten Familie eukaryotischer TEA/ATTS-Regulatoren in der Hefe. In einem ersten Teil sollte untersucht werden, wie Tec1 durch die beiden MAPK Fus3 und Kss1 reguliert wird und welche Rolle dieser Regulation bei der Konjugation und der Biofilmbildung zukommt. Hier konnte gezeigt werden, dass Tec1 als positiver Regulator von G1-spezifischen Zyklinen während der Konjugation über Fus3-spezifische Phosphorylierung destabilisiert und abgebaut werden muss, damit der für die Verschmelzung von Partnerzellen notwendige Zellzyklusarrest effizient erfolgen kann. Die MAPK Kss1 reguliert Tec1 ebenfalls, jedoch nicht auf Proteinebene, sondern auf der Ebene der *TEC1*-Genexpression über den Transkriptionsfaktor Ste12. Dieser Mechanismus ist für die Konjugation nicht entscheidend, jedoch für die adhäsive Wachstumsform und die Biofilmbildung, da Tec1 die Expression des für die Adhäsion notwendigen Flokkulins *FLO11* sicherstellt. Diese Ergebnisse zeigen, wie zwei verwandte MAPK über unterschiedliche Regulation eines einzelnen Transkriptionsfaktors verschiedene Entwicklungsprogramme steuern können.

In einem zweiten Teil wurde die Regulation von Tec1 durch Nährstoffe untersucht, insbesondere durch Mangelbedingungen, welche den Eintritt in die stationäre Phase bewirken. Hier konnte gezeigt werden, dass Tec1 bei akutem Stickstoff- oder Aminosäuremangel ebenfalls destabilisiert und abgebaut wird. Diese Regulation des Transkriptionsfaktors hängt jedoch nicht von den MAPK Fus3 und Kss1 ab, sondern benötigt Elemente des TOR-Signalwegs, und zwar den TOR-Komplex 1, die PP2A-verwandte Phosphatase Sit4, die Proteinkinase Npr1 und die HECT-Ubiquitinligase Rsp5. Vergleichbar mit der Konjugation könnte die physiologische Relevanz des Nährstoffmangel-induzierten Abbaus von Tec1 ebenfalls in der Verhinderung der G1-Zyklinenexpression durch diesen Transkriptionsfaktor liegen, damit die Hefe bei akuten Mangelbedingungen effizient in die stationäre Phase eintreten kann.

Summary

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a dimorphic fungus, which is able to differentiate its growth form depending on the environmental conditions. Under good nutrient conditions, haploid yeast cells can undergo sexual conjugation with a partner cell to form a diploid cell. In contrast, certain conditions of nutrient limitation inhibit conjugation and stimulate an adhesive growth form, which allows cells of the same mating type to form biofilms and to adhere to surfaces. The execution of these different developmental programs is under control of a conserved MAPK module, whose central part consists of the MAPK Fus3 and Kss1 and the transcription factors Ste12 and Tec1. Finally, severe nutrient starvation conditions induce entry into stationary phase, which is under control of the complex TOR signaling network.

The focus of this work is on the regulation of the transcription factor Tec1, which is the only representative of the conserved family of eukaryotic TEA/ATTS regulators in yeast. In the first part, this work attends to the question how Tec1 is regulated by the two MAPK Fus3 and Kss1 and how this regulation affects conjugation and biofilm formation. It could be shown that during conjugation Tec1, which is a positive regulator of G1-specific cyclin genes is destabilized and degraded upon Fus3-dependent phosphorylation. Downregulation of Tec1 is prerequisite for efficient cell cycle arrest required for fusion of the sexual partner cells. The MAPK Kss1 also regulates Tec1, however not on the protein level, but on the level of *TEC1* gene expression via the transcription factor Ste12. This mechanism is not critical for conjugation, but for adhesive growth and biofilm formation because Tec1 is required for expression of *FLO11*, a gene encoding for a cell surface flocculine required for cellular adhesion. These results demonstrate that two related MAPK control different developmental programs through differential regulation of a single transcription factor.

The second part of this work attends to the question of how Tec1 is regulated by nutrient conditions that lead to entry into stationary phase. It could be shown that Tec1 is also destabilized and degraded in response to severe nitrogen or amino acid starvation. This regulation of the transcription factor does not depend on the MAPK Fus3 and Kss1, but requires components of the TOR signaling pathway, the TOR complex 1, the PP2A-related phosphatase Sit4, the protein kinase Npr1 and the HECT ubiquitin ligase Rsp5. Comparable to the conjugation process, the physiological relevance of nutritionally induced degradation of Tec1 could be the downregulation of G1 cyclin gene expression, which is a prerequisite for entry into stationary phase upon severe nutrient deprivation.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Soweit nicht anders angegeben gilt das "Système International d'unités" (SI) und seine abgeleiteten Einheiten. Desweiteren wurde die biochemische Nomenklatur der "International Union of Biochemistry and Molecular Biology" verwendet :

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>

Akronyme, deren Ursprung für das Verständnis förderlich sind, wurden im Text bei der Einführung des Begriffes übersetzt.

∅.....	Durchmesser	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
λ.....	Wellenlänge	kb.....	Kilobasenpaare
°C.....	Grad Celsius	mRNA.....	"Messenger RNA"
Ac	Acetat	MWCO	"Molecular weight cut off"
AMP	Adenosinmonophosphat	NMR	"Nuclear magnetic resonance"
Amp.....	Ampicillin	N-terminal	Amino-terminal
APS.....	Ammoniumpersulfat	OD.....	Optische Dichte
ATP	Adenosintri-phosphat	o-NPG.....	o-Nitrophenol-galaktosid
bp	Basenpaare	ORF.....	"Open reading frame"
BSA	"Bovine serum albumin"	PAGE.....	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
cAMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat	PBS	"Phosphate-buffered saline"
C-terminal	Carboxy-terminal	PCR.....	"Polymerase chain reaction"
Da	Maßeinheit "Dalton"	PEG.....	Polyethylenglykol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser	pH.....	<i>Potentia hydrogenii</i>
DNA	"Desoxyribonucleic acid"	PMSF.....	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTP	Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat	RNA.....	"Ribonucleic acid"
DTT	Dithiothreitol	rpm.....	Rotationen pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>et al.</i>	und andere	TAE.....	Tris/Acetat/EDTA
EtOH.....	Ethanol	TE.....	Tris-EDTA (-Puffer)
×g.....	Erdbeschleunigung	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
GDP	Guanosindiphosphat	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
GEF	"Guanine nucleotide exchange factor"	Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
GFP.....	Grün-fluoreszierendes Protein	UV.....	Ultraviolettstrahlung
GST	Glutathion-S-Transferase	v/v	"Volume per volume"
GTP	Guanosintri-phosphat	w/v	"Weight per volume"

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungen und Fachbegriffe	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellsystem	1
1.2. Der Transkriptionsfaktor Tec1	3
1.2.1. Die Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren	3
1.2.2. Die Domänenstruktur von Tec1	6
1.2.3. Mechanismus der Tec1-Zielgenkontrolle	7
1.2.4. Tec1 als Regulator des <i>Ty1</i> -Transposons und der Gene des G1-Zyklins Cln1 und des Zelloberflächenflokku- lins Flo11	9
1.3. Signaltransduktion und Regulation von Tec1	12
1.3.1. Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen	12
1.3.2. Signaltransduktionswege für Pheromonantwort und adhäsives Wachstum	15
1.4. Der TOR-Signalweg	16
1.4.1. Die TOR-Komplexe 1 und 2	17
1.4.2. TORK1-abhängige Signaltransduktionswege	20
1.4.2.1. TORK1-kontrollierte Phosphatasemodule	20
1.4.2.2. Der Ras2 / cAMP-Signalweg	22
1.4.2.3. Stickstoff-Katabolit-Repression und Steuerung von Aminosäurepermeasen	24
1.4.2.4. Die HECT-E3-Ligase Rsp5	26
1.4.2.5. Generelle Kontrolle der Aminosäurebiosynthese	27
1.5. Ziele dieser Arbeit	28
2. Ergebnisse	29
2.1. Regulation von Tec1 durch den Pheromon-induzierten MAPK-Signalweg	30
2.1.1. Tec1 interagiert mit Fus3 und Kss1 über unterschiedliche Domänen	30
2.1.2. Fus3, aber nicht Kss1 phosphoryliert Tec1 <i>in vitro</i>	32
2.1.3. Tec1 wird unter Pheromoneinfluss posttranslational von Fus3 reguliert	33
2.1.4. Ein MAPK-Phosphorylierungsmotif in Tec1 ermöglicht die Regulation durch Pheromon	35
2.1.5. Der Pheromon-induzierte Abbau von Tec1 ist für einen effizienten Zellzyklusarrest notwendig	37
2.1.6. Die Regulation der Substratadhäsion durch Kss1 und Fus3 wird über Tec1 vermittelt	38
2.2. Regulation von Tec1 durch Nährstoffe und TOR	41
2.2.1. Tec1 wird durch Nährstoffe reguliert	41
2.2.2. Ein neuer Antikörper gegen Tec1 bestätigt die negative Regulation durch Rapamycin	42
2.2.3. Die <i>TEC1</i> -Transkriptmenge wird durch Rapamycin nicht beeinflusst	45
2.2.4. Rapamycin verringert die Stabilität des Tec1-Proteins	46

2.2.5. Die Deletion des Gens der Phosphatase Sit4 blockiert den Effekt von Rapamycin auf Tec1	47
2.2.6. Die generelle Kontrolle der Aminosäurebiosynthese hat keinen Einfluss auf den Abbau von Tec1	49
2.2.7. Der Ras2 / cAMP-Signalweg wird für die Rapamycin-induzierte Regulation von Tec1 nicht benötigt	50
2.2.8. Die Proteinkinase Npr1 und die HECT-Ubiquitinligase Rsp5 sind am Rapamycin-induzierten Abbau von Tec1 beteiligt	52
2.2.9. Die Kernlokalisierung von Tec1 wird durch Rapamycin und Rsp5 nicht beeinflusst	56
2.2.10. Rsp5 interagiert mit Tec1 <i>in vitro</i>	58
2.2.11. Die MAP-Kinasen der Bäckerhefe sind an der Regulation von Tec1 unter Rapamycin nicht beteiligt	59
2.2.12. Identifizierung von weiteren E3-Ligasen, welche die Stabilität von Tec1 beeinflussen	62
3. Diskussion.....	66
3.1. Regulation von Tec1 durch Pheromon	67
3.1.1. Die MAPK Fus3 und Kss1 regulieren Tec1 diametral.....	67
3.1.2. Die Spezifität unter dem Einfluss von Pheromon wird durch wechselnde Aktivierungsstärke der MAPK Fus3 und Kss1 erreicht.....	70
3.2. Regulation von Tec1 durch den TOR-Signalweg	73
3.2.1. Die Stabilität von Tec1 unterliegt einer TOR-Komplex1-abhängigen Regulation	73
3.2.2. Die PP2A-verwandte Phosphatase Sit4 vermittelt die Destabilisierung des Tec1-Proteins bei inaktivem TOR-Komplex 1	74
3.2.3. Teile eines Stickstoff-Katabolit-Repression-Signalweges regulieren Tec1	75
3.3. Vergleich der Pheromon-induzierten und der Nährstoff-abhängigen Regulation von Tec1	79
3.3.1. Signalwege und Abbau des Tec1-Proteins	79
3.3.2. Physiologische Relevanz.....	80
4. Material & Methoden.....	82
4.1. Material.....	83
4.1.1. Allgemeine Materialien	83
4.1.2. <i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	84
4.1.3. <i>E. coli</i> -Stämme und Plasmide	90
4.1.4. Oligonukleotide	93
4.2. Methoden	95
4.2.1. Kultivierung der Mikroorganismen	95
4.2.1.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	95
4.2.1.2. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	95
4.2.2. DNA-Präparation	96
4.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> : "STET Prep"	96
4.2.2.2. QIAprep® Spin Miniprep.....	96
4.2.2.3. Isolierung der Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> : "Smash & Grab"	96
4.2.2.4. Isolierung von Plasmiden aus <i>S. cerevisiae</i> zur Retransformation	97
4.2.3. Klonierungstechniken.....	97

4.2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion "PCR"	97
4.2.3.2. Restriktion von DNA	98
4.2.3.3. Dephosphorylierung und Ligation von DNA.....	98
4.2.3.4. Agarose-Gelelektrophorese	98
4.2.3.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose.....	98
4.2.3.6. Sequenzspezifische Mutagenese	99
4.2.4. Transformationsmethoden.....	99
4.2.4.1. Transformation von <i>E. coli</i> : "SOC-Methode"	99
4.2.4.2. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	100
4.2.4.3. Transformation von <i>S. cerevisiae</i> : "One-step trafo"	100
4.2.5. Analyse von RNA.....	100
4.2.5.1. Präparation von RNA	100
4.2.5.2. Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese	101
4.2.5.3. Herstellung von Sonden-DNA	101
4.2.5.4. Transfer und Hybridisierung von RNA: Northern-Hybridisierung	102
4.2.6. Analyse von DNA.....	102
4.2.6.1. Sequenzierung von DNA.....	102
4.2.6.2. Southern-Hybridisierung	103
4.2.7. Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Proteinen.....	103
4.2.7.1. Tec1 ¹⁻²⁸⁰	103
4.2.7.2. MBP-Tec1-FLAG	104
4.2.8. α -Tec1: Produktion und Reinigung des Antikörpers	105
4.2.9. Analyse von Proteinen.....	106
4.2.9.1. Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für den photometrischen β -Galaktosidasetest	106
4.2.9.2. Photometrischer β -Galaktosidasetest.....	106
4.2.9.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	107
4.2.9.4. Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für die immunochemische Detektion: Mechanischer Zellaufbruch.....	107
4.2.9.5. Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> für die immunochemische Detektion: Chemischer Zellaufbruch	107
4.2.9.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: "SDS-PAGE"	108
4.2.9.7. Immunochemische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen: "Western-Analyse"	108
4.2.9.8. Co-Affinitätsreinigung: "GST-Pulldown"	110
4.2.9.9. Messung der <i>in vitro</i> -Phosphorylierung: "Kinase Assay"	110
4.2.9.10. Silberfärbung	111
4.2.10. Untersuchung von <i>S. cerevisiae</i>	111
4.2.10.1. Waschtest zur Bestimmung des haploiden invasiven Wachstums.....	111
4.2.10.2. Halo-Test	112
4.2.10.3. Fluoreszenzmikroskopie.....	112
4.3. Bezugsquellen	112
5. Literatur.....	113

1. EINLEITUNG

1.1. *Saccharomyces cerevisiae* als Modellsystem

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird taxonomisch innerhalb des Reiches der Pilze in die Klasse der Hemiascomyzeten eingeordnet. Die Bezeichnung "Hefe" klassifiziert kein phylogenetisches Taxon sondern eine heterogene Gruppe von Pilzen mit dem gemeinsamen Merkmal eines einzelligen Thallus. Zu den natürlichen Habitaten von *S. cerevisiae* gehört die Oberfläche von Pflanzen, insbesondere die der Früchte. Die Bäckerhefe wurde bereits vor 6000 Jahren für die Produktion von Brot und Bier verwendet und hat sich auch als Kulturfolger des Menschen entwickelt. Sie ist ein dimorpher Organismus, der sich abhängig von seinem Nährstoffangebot in verschiedene Zelltypen differenzieren kann (Abb. 1).

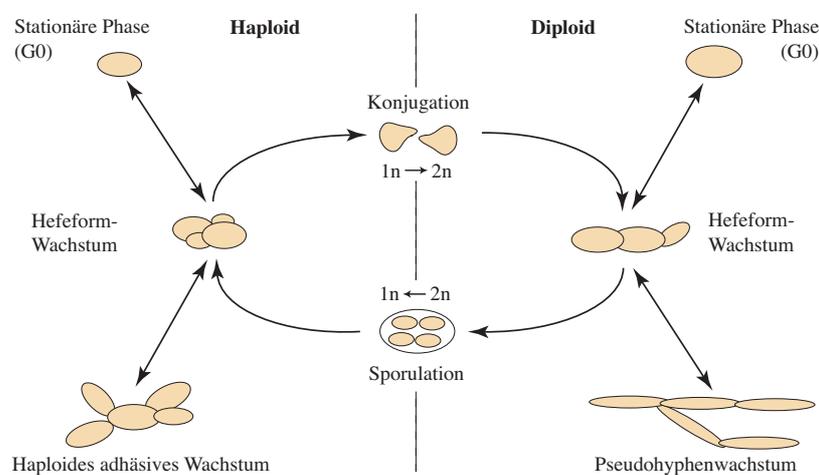


Abb. 1: Der Lebenszyklus von *S. cerevisiae*.

Die Bäckerhefe kann sich vegetativ sowohl haploid als auch diploid vermehren. Haploide Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps können konjugieren und diploide Zellen bilden. Auf eine schlechte Versorgung von Kohlenstoffquellen können beide Formen durch den Eintritt in eine stationäre Phase (G0) reagieren. Bei schlechter Stickstoffversorgung bilden diploide Hefezellen filamentöse Pseudothyphen aus. Ein verwandtes Phänomen bei haploiden Zellen wird invasives oder adhäsives Wachstum genannt. Gleichzeitiger Mangel an Kohlenstoff- und Stickstoffquellen veranlasst diploide Zellen zur Sporulation.

Haploide Hefen umfassen die Geschlechtstypen *MATa* und *MAT α* , die bei wild lebenden Hefen einen Paarungstypwechsel durchlaufen können. Diese als homothallisch bezeichneten Stämme können ihren aktiven Geschlechtstyp-Lokus gegen einen jeweils bis dahin inaktiven austauschen und eine vormals eingeschlechtliche Population zur sexuellen Reproduktion befähigen. Laborstämme der Bäckerhefe tragen dagegen eine Mutation im Gen der HO-Endonuklease, die diesen Austausch verhindert. Sie sind heterothallisch und bilden genetisch stabile Populationen. Bei ausreichender Nährstoffversorgung vermehren sich sowohl haploide als auch diploide Zellen in der einzelligen Hefeform durch einen Abschnürvorgang, der als Sprossung oder Knospung bezeichnet wird. Haploide Zellen

unterschiedlichen Geschlechtstyps versuchen unter diesen Bedingungen, durch den sexuellen Akt der Konjugation ein diploides Stadium zu erlangen. Die Hefezellen kommen durch "Shmooing", ein Aufeinanderzuwachsen, in direkten Zell-Zellkontakt. Durch Plasmogamie und Karyogamie entsteht eine diploide Zelle des Geschlechts *MATa/α*. Dieser sexuelle Schritt ermöglicht im Vergleich zur Sprossung eine höhere genetische Variabilität. Tritt ein Mangel an verwertbaren Kohlenstoffquellen auf, arretieren sowohl haploide als auch diploide Hefezellen ihren Zellzyklus in der G1-Phase und versuchen, den Zeitraum der Unterversorgung in einer stationären Phase (G0) zu überdauern. Bei moderatem Stickstoffmangel und gleichzeitiger Verfügbarkeit nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen wird in diploiden Zellen die Meiose und anschließende Sporulation ausgelöst. Dabei entstehen in einem als Tetrade bezeichneten Askus vier widerstandsfähige haploide Sporen, die unter besseren Bedingungen wieder auskeimen. Bei Stickstoffmangel in Gegenwart einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle beginnen diploide Hefen mit der Bildung von filamentösen Pseudohyphen (Gimeno *et al.*, 1992). Die Zellmorphologie verändert sich von einer nahezu runden zu einer deutlich verlängerten Zellform. Die Zellen werden länger und dünner und knospen bevorzugt unipolar am distalen Pol, also gegenüber der eigenen Geburtsnarbe. Dabei lösen sich Mutter- und Tochterzelle nach der Teilung nicht vollständig voneinander und bilden so Zellverbände, die sich nicht nur über das Substrat ausbreiten, sondern es auch invasiv besiedeln (Gimeno *et al.*, 1992; Kron *et al.*, 1994). Ein ähnlicher Phänotyp lässt sich unter bestimmten Nährstoffmangelbedingungen, wie z. B. Glukosemangel, auch für haploide Hefezellen feststellen (Cullen und Sprague, 2000). Bei dem haploid-invasiven oder -adhäsiven Wachstum verlängern sich die Zellen nur leicht und zeigen ein bipolares Sprossungsmuster. Sie bleiben ebenfalls nach der Teilung miteinander verbunden und wachsen invasiv in ihr Substrat bzw. adhäsiv auf ihm. Das adhäsive Wachstum ist allerdings begrenzt und geht nicht, wie es bei den Pseudohyphen der Fall ist, über den Kolonierand hinaus (Roberts und Fink, 1994). Die Möglichkeit der pseudohyphalen und adhäsiven Wachstumsform ermöglicht der Hefe wahrscheinlich, neue Nährstoffquellen zu erschließen (Gimeno *et al.*, 1992). Diese Wachstumsformen als Antwort auf wechselnde Umweltbedingungen ähneln den morphologischen Veränderungen, die einige pathogene Pilze, wie z. B. *Candida albicans* oder *Ustilago maydis*, für die Infektion eines Wirtes ausbilden. Die Fähigkeit dieser Pilze, eine bestimmte Form von Filamenten zu bilden, korreliert mit dem Grad ihrer Pathogenität (Bölker, 2001; Ernst und Schmidt, 2000). Das invasive Wachstum ermöglicht beispielsweise *C. albicans* die Überwindung natürlicher Barrieren des Wirtsorganismus und ist damit der Hauptvirulenzfaktor (Ernst und Schmidt, 2000). Des Weiteren konnte hier nachgewiesen werden, dass Mutanten mit defekter Hyphenbildung eine deutliche Verringerung ihrer Virulenz erfahren (Lo *et al.*, 1997).

S. cerevisiae ist neben seinen technologischen Anwendungen in der Nahrungsmittelindustrie und Biotechnologie ein generelles Modell für eukaryotische

Zellen. Sie lässt sich im Labor unter gut reproduzierbaren Bedingungen und zu vergleichsweise geringen Kosten kultivieren. Die Bäckerhefe war der erste eukaryotische Organismus, dessen Genom komplett sequenziert wurde (Goffeau *et al.*, 1996), und enthält das derzeit am besten untersuchte eukaryotische Erbgut weltweit (Cliften *et al.*, 2003; Dujon *et al.*, 2004). Gene anderer Organismen, inklusive denen des Menschen, können in *S. cerevisiae* exprimiert werden und tragen so zum besseren Verständnis genetisch weniger leicht zugänglicher Organismen bei. Die Grundprinzipien des eukaryotischen Zelltyps sind so konserviert, dass sich auch medizinisch relevante Gene mit Hilfe ihrer Homologe in der Bäckerhefe studieren lassen und damit die Entwicklung innovativer Medikamente vorantreiben (Marton *et al.*, 1998; Melese und Hieter, 2002).

1.2. Der Transkriptionsfaktor Tec1

1.2.1. Die Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren

Die Mitglieder der Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren sind durch die hoch konservierte TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne gekennzeichnet. Ihre Vertreter wurden bislang in praktisch allen untersuchten Pilzen und Animalia gefunden. Zur Zeit der Namensgebung durch T. R. Bürglin (1991) waren *TEF-1* aus *Homo sapiens* (Xiao *et al.*, 1991), *TEC1* aus *S. cerevisiae* (Laloux *et al.*, 1990) und *abaA* aus *Aspergillus nidulans* (Mirabito *et al.*, 1989) bekannt, daher "TEA". Wenig später wurde das Akronym um *Scalloped (Sd)* aus *Drosophila melanogaster* auf "ATTS" erweitert (Campbell *et al.*, 1991; Campbell *et al.*, 1992). Mit fortschreitender Annotierung anderer Organismen wurden weitere Mitglieder dieser Familie gefunden (Abb. 2).

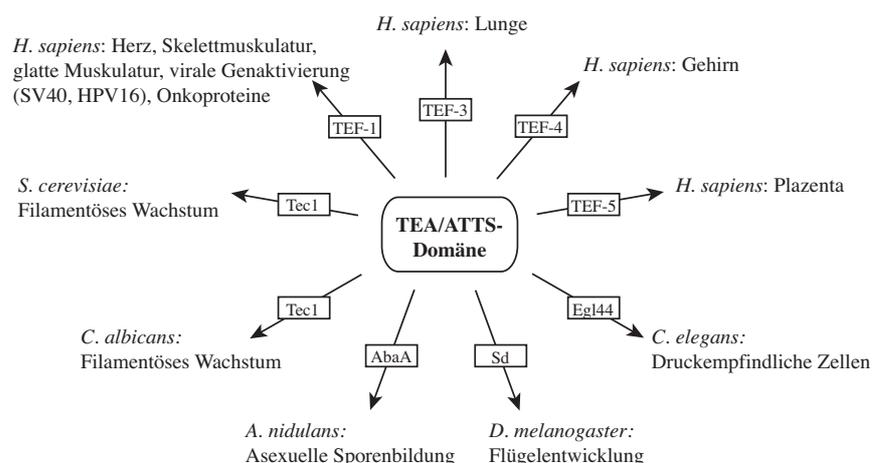


Abb. 2: Die Familie der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren.

Transkriptionsfaktoren mit der konservierten TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne sind an Differenzierungsvorgängen in Pilzen und Animalia beteiligt. Abgesehen von dieser Domäne sind die Sequenzähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Vertretern jedoch gering. (modifiziert nach Anbanandam *et al.*, 2006).

In *H. sapiens* sind vier Transkriptionsfaktoren mit der TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne bekannt, die in anderen höheren Eukaryoten (z. B. *Mus musculus*, *Gallus gallus*) ebenfalls gefunden wurden: TEF-1, TEF-3, TEF-4 und TEF-5. Dabei reguliert TEF-1 die Entwicklung von Herz-, Skelett- und glatter Muskulatur (Mar und Ordahl, 1990; Hsu *et al.*, 1996; Farrance und Ordahl, 1996), wurde jedoch zuvor bereits als Verstärker viraler Gene von Simian-Virus 40 (SV40) und Papillomavirus-16 (HPV16) beschrieben (Xiao *et al.*, 1991; Ishiji *et al.*, 1992). TEF-3 wird in Lunge und Leber stark exprimiert, aber auch in mitotisch stimulierten Fibroblasten (Hsu *et al.*, 1996). Das TEF-4-Homolog aus *M. musculus*, mTEAD2, ist in der frühen embryonalen Entwicklungsphase für die TEA/ATTS-abhängige Transkription hinreichend (Kaneko und DePamphilis, 1998), während TEF-5 in der Plazenta exprimiert wird (Jiang *et al.*, 1999). Das später ebenfalls namensgebende Ortholog Scalloped aus *D. melanogaster* ist an der Flügelentwicklung beteiligt (Bray, 1999). In *Caenorhabditis elegans* wurde Egl44 als Mitglied der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren entdeckt. Es reguliert die Entwicklung von druckempfindlichen Zellen und hermaphrodit-spezifischen Neuronen, die für die Eiablage benötigt werden (Wu *et al.*, 2001). Innerhalb der TEA/ATTS-Domäne sind sich die Transkriptionsfaktoren aus den unterschiedlichen Organismen sehr ähnlich. Die DNA-Bindedomänen der TEFs erreichen untereinander 95% Identität und auch die Transkriptionsfaktoren evolutionär weiter voneinander entfernter Organismen wie *H. sapiens* und *S. cerevisiae* teilen sich noch 50% identische Aminosäuren in dieser Region (Abb. 3).

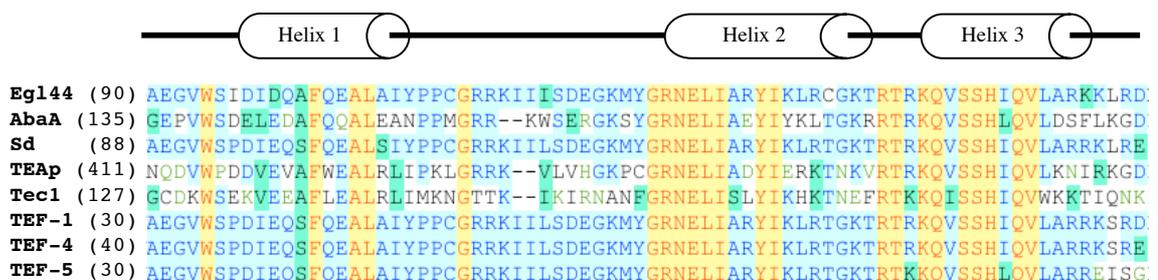


Abb. 3: "Alignment" von TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren.

Abgebildet ist ein "Alignment" der Aminosäuresequenz der TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne von verschiedenen Vertretern dieser Familie, die sich im Reich der Pilze und Animalia finden. Darüber befindet sich das Strukturmodell dieses Bereiches nach Anbanandam *et al.*, 2006. Die Transkriptionsfaktoren der TEA/ATTS-Familie verfügen nur im Bereich der DNA-Bindedomäne über eine ausgeprägte Homologie zueinander. Die stärkste Konservierung findet sich in den Struktur bestimmenden Regionen der drei Helices. Sie bilden zusammen ein "Helix-Loop-Helix-Loop-Helix"-Motiv, das der Homeodomäne stark ähnelt. Gezeigt sind Sequenzabschnitte von Egl44 aus *C. elegans*, AbaA aus *A. nidulans*, Sd aus *D. melanogaster*, einem noch nicht benannten TEA/ATTS-Protein aus *U. maydis* (TEAp), Tec1 aus *S. cerevisiae*, TEF-1 aus *H. sapiens*, TEF-4 aus *M. musculus* und TEF-5 aus *G. gallus*.

Die TEA/ATTS-Transkriptionsfaktoren, die im Reich der Pilze gefunden wurden, weisen untereinander wiederum eine höhere Homologie auf. Außerhalb der TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne gibt es zwar nur wenig Sequenzübereinstimmung in der Familie dieser Transkriptionsfaktoren, jedoch insgesamt die Tendenz, funktionell an der Regulation zellulärer Differenzierungsprozesse beteiligt zu sein. Dabei treten sie teilweise als autarke Regulatoren und teilweise als Verstärker eines übergeordneten Mechanismus auf. AbaA aus *A. nidulans* ist an der asexuellen Sporenentwicklung beteiligt (Mirabito *et al.*, 1989) und induziert nach Überexpression in einer *tec1*-Deletionsmutante von *S. cerevisiae* das filamentöse Wachstum. Die Deletion des einen Transkriptionsfaktors konnte also durch den anderen komplementiert werden (Gavrias *et al.*, 1996). Im Humanpathogen *C. albicans* ist Tec1 ebenfalls an der Regulation des invasiven/adhäsiven Wachstums beteiligt. Die Virulenz von *Candida*-Arten ist abhängig von dieser Wuchsform (Lo *et al.*, 1997), weil mit ihr natürliche Barrieren des Wirtsorganismus überwunden werden können (Ernst und Schmidt, 2000). Im Pflanzenpathogen *U. maydis*, dem Erreger des Maisbrands, wurde ebenfalls ein Protein mit einer TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne entdeckt. Seine Funktion ist jedoch bislang unbekannt.

Die TEA/ATTS-Domäne weist starke Ähnlichkeiten zu der Homeodomäne anderer Transkriptionsfaktoren auf. Die Homeodomäne ist eine Region von ca. 60 Aminosäuren, die ein "Helix-Loop-Helix-Turn-Helix"-Motiv ausbildet. Dabei bindet die dritte Helix als Erkennungshelix sequenzspezifisch in der großen Furche der DNA. Die Helices 1 und 2 liegen außerhalb der DNA-Doppelhelix in antiparalleler Anordnung eng beieinander (Gehring *et al.*, 1994). Bei der NMR-Strukturaufklärung bestätigte die Tertiärstruktur der TEA/ATTS-Domäne von TEF-1 die bereits vorhergesagten drei Helices und die strukturellen Ähnlichkeiten zur Homeodomäne. Helix 1 und Helix 2 verlaufen nahezu antiparallel, Helix 3 ist demgegenüber um ca. 100° gedreht und für den direkten DNA-Kontakt verantwortlich (Abb. 4).

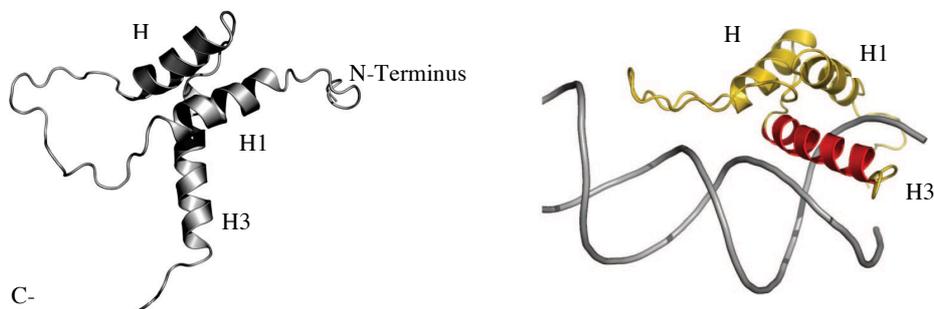


Abb. 4: Strukturmodell der TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne.

Die Abbildung zeigt zwei Modelle der Tertiärstruktur der TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne von *H. sapiens* TEF-1 nach Daten einer NMR-Strukturaufklärung. Linke Seite: Die Helices 1 und 2 (H1 und H2) sind gegenüber Helix 3 (H3) um ca. 100° verdreht. Rechte Seite: Die dritte Helix vermittelt die Interaktion mit der DNA-Doppelhelix (modifiziert nach Anbanandam *et al.*, 2006).

Das Gesamtmotiv folgt ebenfalls der Struktur "Helix-Loop-Helix-Turn-Helix", wonach sich die TEA/ATTS-Domäne zur strukturellen Familie der Homeodomäne zählen ließe. Die Aminosäuresequenz und DNA-Sequenzspezifität von TEA/ATTS- und Homeodomäne sind jedoch unterschiedlich, und Transkriptionsfaktoren beider Vertreter können sich nicht gegenseitig substituieren (Anbanandam *et al.*, 2006).

1.2.2. Domänenstruktur von Tec1

Das Tec1-Protein aus *S. cerevisiae* umfasst 486 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 55,2 kDa. Die konservierte TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne liegt in der N-terminalen Hälfte zwischen den Aminosäuren 128 und 192. Über die gesamte Länge des Proteins wurden *in silico* insgesamt acht mögliche MAPK-Phosphorylierungsstellen mit der minimalen Konsensussequenz Serin/Threonin-Prolin gefunden (S86, T252, T273, T297, S325, S462, S469, T476). Über den Bereich der C-terminalen Hälfte von Tec1 zwischen den Aminosäuren 300 und 400 kann die Bindung eines weiteren Transkriptionsfaktors, Ste12, erfolgen (Chou *et al.*, 2006) (siehe hierzu auch 1.2.3.). Ihre Bedeutung ist nicht abschließend geklärt, da für die kooperative Aktivierung eines FRE-Elementes ("Filamentation and invasion response element"; kombinierte DNA-Bindesequenz für Tec1 und Ste12) zusammen mit Ste12 nur die N-terminale Hälfte von Tec1 (Aminosäure 1-257) benötigt wird (Köhler *et al.*, 2002). Wahrscheinlich ist die Verbindung beider Transkriptionsfaktoren hier nicht essentiell, da im FRE für beide die passenden DNA-Bindesequenzen vorhanden sind. Bei der TCS-Kontrolle, der Aktivierung eines TCS-Elementes ("Tec1 consensus sequence"; DNA-Bindesequenz für Tec1) in Abwesenheit von Ste12, ist hingegen das gesamte Tec1-Protein nötig. Anscheinend erfolgt hier die Transkriptionsaktivierung der RNA-Polymerase II allein durch Tec1 (Abb. 5) (Köhler *et al.*, 2002).

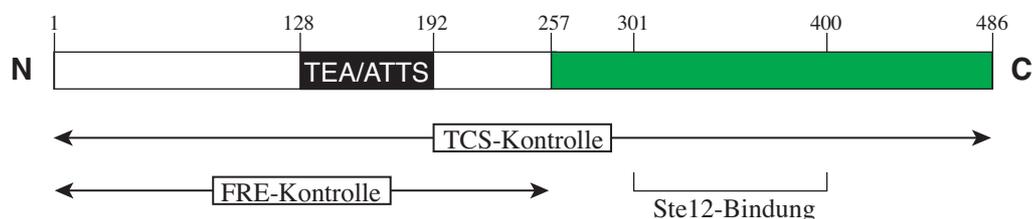


Abb. 5: Domänenstruktur von Tec1.

Abgebildet ist ein Bandmodell des Tec1-Proteins. Der Transkriptionsfaktor erstreckt sich über 486 Aminosäuren. Seine konservierte TEA/ATTS-DNA-Bindedomäne befindet sich in der N-terminalen Hälfte, die für die FRE-Kontrolle benötigt wird. Die TCS-Kontrolle ist dagegen auch vom C-terminalen Bereich abhängig. Hier befindet sich auch die Interaktionsdomäne für Ste12.

Über die posttranslationale Regulation des Transkriptionsfaktors ist wenig bekannt. Außer den putativen MAPK-Phosphorylierungssequenzen finden sich *in silico* (Proteomics-Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik: <http://ca.expasy.org/>) zwei mögliche PKA-Phosphorylierungssequenzen in der C-terminalen Hälfte von Tec1 und zwölf PKC-Phosphorylierungssequenzen über das gesamte Protein verteilt. Für eine physiologische Relevanz dieser Sequenzen gibt es jedoch bislang keine Hinweise. Für das *H. sapiens*-Homolog TEF-1 ist bekannt, dass die DNA-Bindeaktivität durch Phosphorylierung eines Serins in der TEA/ATTS-Domäne durch die PKA (Gupta *et al.*, 2000) und eines weiteren Serins durch die PKC reguliert wird (Jiang *et al.*, 2001). Die entsprechenden Motive fehlen jedoch in der DNA-Bindedomäne von Tec1 aus *S. cerevisiae*.

1.2.3. Mechanismus der Tec1-Zielgenkontrolle

Tec1 wurde zuerst als ausschließlich verstärkender Transkriptionsfaktor betrachtet, der zur vollen Transkriptionsaktivierung noch den Transkriptionsfaktor Ste12 benötigt (Company *et al.*, 1988; Laloux *et al.*, 1990). Die DNA-Sequenzen, die für eine Tec1- und Ste12-abhängige Aktivierung der Transkription benötigt werden, wurden zunächst SRE ("Sterile response element") und später FRE genannt. Sie enthalten eine als PRE bezeichnete Ste12-Bindestelle ("Pheromone response element") mit der Konsensussequenzen "TGAAAC" direkt neben einem TCS-Element, der Bindesequenz für Tec1 (Laloux *et al.*, 1994; Baur *et al.*, 1997; Madhani und Fink, 1997). Die Bindung dieses TCS-Elements erfolgt in *S. cerevisiae* über die Konsensussequenz "CATTCC" (Laloux *et al.*, 1990, 1994; Madhani und Fink, 1997) oder deren Erweiterung "CATTCYY" (Harbison *et al.*, 2004). Für die TEA/ATTS-Domäne von TEF-1 wurden diese Nukleotidabfolgen vor kurzem bestätigt und durch *in vitro* bindefähige Sequenzen erweitert. Sie gelten vermutlich (mit Variationen in der sechsten Position) für alle Transkriptionsfaktoren dieser Familie (Anbanandam *et al.*, 2006). Ste12 wurde ursprünglich als Transkriptionsfaktor Pheromon-regulierter Gene beschrieben, die PRE in ihrer Promotorregion aufwiesen (Fields und Herskowitz, 1985; Kronstad *et al.*, 1987; Van Arsdell *et al.*, 1987). Dabei ist die Bindung von Ste12 an einzelne PRE vergleichsweise schlecht. In den Zielgenen von Ste12 kommen zumeist Cluster von PRE vor, die kooperativ gebunden werden (Yuan und Fields, 1991). Einzelne PRE vermitteln Transkriptionsaktivierung, wenn durch angrenzende Bindesequenzen weiterer Transkriptionsfaktoren, wie Tec1 oder Mcm1, das kombinierte Verstärkerelement kooperativ von einem Heterodimer beider Faktoren gebunden wird (Baur *et al.*, 1997; Madhani und Fink, 1997).

Ste12 und Tec1 werden von den MAPK Fus3 und Kss1 reguliert, die bei der Konjugation teilweise die gleichen Funktionen aufweisen (Elion *et al.*, 1991; Bardwell, 2005). Beide können die redundanten Inhibitoren von Ste12, Dig1 und Dig2, binden und

phosphorylieren (Cook *et al.*, 1996; Tedford *et al.*, 1997). Dig1 bindet die mittlere Region des Ste12-Proteins, die für die Transkriptionsaktivierung nach Pheromon-Induktion benötigt wird, während Dig2 den N-terminalen Teil bindet (Olson *et al.*, 2000).

Für die DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung durch Ste12 und Tec1 bestehen mechanistisch verschiedene Möglichkeiten (Abb. 6): PRE-Sequenzen werden überwiegend durch einen Komplex aus Ste12, Dig1 und Dig2 gebunden. Etwas seltener findet sich an den Bindesequenzen ein Komplex, in dem Dig2 durch Tec1 ersetzt ist. Es bindet über seinen C-Terminus ebenfalls den N-terminalen Bereich von Ste12, und scheint Dig2 kompetitiv zu verdrängen. Tec1 wird jedoch von keinem der Dig-Proteine direkt gebunden (Chou *et al.*, 2006). Auch in einem *ste12*-Deletionshintergrund vermag Tec1 einen Reporter mit einem einzelnen TCS-Element zu aktivieren, verfügt also auch ohne Ste12 über das Potential zur Transkriptionsaktivierung (Köhler *et al.*, 2002). Neben dieser als TCS-Kontrolle bezeichneten Regulation wurden an den TCS-Elementen auch distinkte Komplexe aus Ste12, Dig1, Dig2 und Tec1 gefunden, wobei die DNA-Bindung von Tec1 übernommen wurde.

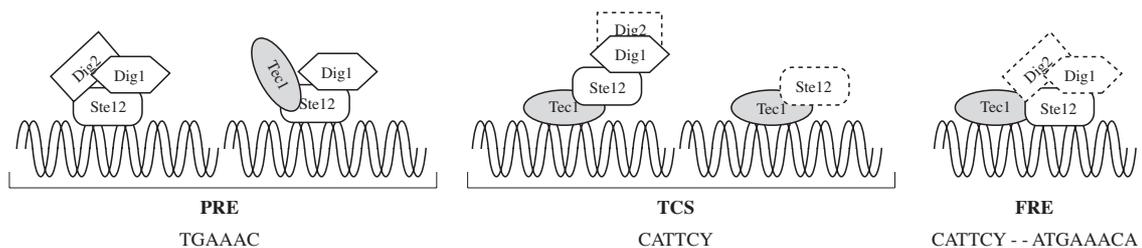


Abb. 6: Mögliche Regulation von FRE und TCS durch Tec1/Ste12/Dig-Komplexe.

An PRE bildet Ste12 zwei Arten von Komplexen, einen mit und einen ohne Tec1. Der mengenmäßig überwiegende Komplex ist jedoch der aus Ste12 und den Dig-Proteinen bestehende. An TCS-Elementen finden sich die gleichen Komponenten, hier erfolgt die DNA-Bindung jedoch ausschließlich über Tec1. Die Aktivierung der Transkription wird hier von Ste12 verstärkt, kann aber auch in seiner Abwesenheit erfolgen. An FRE-Sequenzen binden beide Transkriptionsfaktoren kooperativ an die DNA. Die Folgen einer Phosphorylierung für die dargestellten Komplexe sind nicht untersucht. Unterhalb der Sequenznamen steht die jeweilige Konsensussequenz. Gestrichelte Umrisse weisen auf spekulative Interaktionen hin (modifiziert nach Madhani und Fink, 1997; Köhler *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2006).

An FRE-Elementen scheint der gleiche Komplex vorzuliegen, nur dass hier die DNA-Bindefähigkeit beider Transkriptionsfaktoren genutzt wird (Chou *et al.*, 2006). Unklar ist derzeit der Einfluss der möglichen Phosphorylierungen von Ste12, Dig1 und Dig2 durch Fus3 und Kss1 auf diese Komplexe. Die Quantifizierung von Tec1 (530 Moleküle/Zelle), Dig2 (1310 Moleküle/Zelle), Dig1 (1460 Moleküle/Zelle) und Ste12 (1920 Moleküle/Zelle) in einem Wildtypstamm unter Standardbedingungen offenbarte Tec1 als limitierenden Faktor für die Komplexbildung (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Da

Durch Promotor-Bindestudien, Microarray-Daten und Sequenzvergleiche wurden noch weitere mögliche Zielgene von Tec1 identifiziert (Zeitlinger *et al.*, 2003; Harbison *et al.*, 2004). Die physiologische Relevanz der Tec1-Regulation dieser möglichen Zielgene ist jedoch nicht im Detail bekannt.

Tec1 als Regulator von *CLNI*: Die Kontrolle des Zellzyklus gehört zu den essentiellen Regulationen der Zelle, da DNA-Replikation, zelluläre Differenzierung und Größenwachstum sorgfältig aufeinander abgestimmt sein müssen. Diese Regulation übernehmen in Eukaryoten Zyklin-abhängige Kinasen ("Cyclin-dependant kinase", CDK). Sie sind die katalytischen Untereinheiten von Kinasekomplexen, zu deren Funktionsfähigkeit auch eine regulatorische Zyklin-Untereinheit gehört. Es sind Proteine von ähnlicher Struktur, die teilweise über den Zellzyklus fluktuieren und die Fähigkeit haben, CDKs zu binden (Evans *et al.*, 1983; Morgan, 1995) Die Spezifität und Aktivität der CDKs werden von diesen Zyklinen bestimmt. Eine CDK von zentraler Bedeutung in *S. cerevisiae* ist Cdc28, die zusammen mit den periodisch exprimierten Zyklinen im Verlauf des Zellzyklus verschiedene Komplexe bildet. Diese kontrollieren z. B. den "START"-Kontrollpunkt des Zellzyklus beim Übergang der G1- zur S-Phase sowie den mitotischen Zellteilungsprozess. Je nach der von ihnen kontrollierten Phase sind die Zyklone von Cdc28 in drei Klassen unterteilt: Zur Initiierung des Zellzyklus am "START"-Kontrollpunkt werden die G1-Zyklone Cln1-3, für den Übergang zur S-Phase Clb5-6 und für die Mitose die Zyklone Clb1-4 benötigt. Ihre Präsenz in der Zelle, gesteuert durch oszillierende Expressionsstärke und Proteolyse, folgt diesen Aufgaben (Morgan, 1995; Nasmyth, 1996).

Die Expression von *CLNI* wird durch die Transkriptionsfaktorkomplexe MBF (Swi6-Mbp1) und SBF (Swi6-Swi4) reguliert (Cross *et al.*, 1994; Stuart und Wittenberg, 1994). Das Zyklin Cln3 wirkt dabei transkriptionsaktivierend, die Mitose-Zyklone Clb1-4 hemmend (Dirick *et al.*, 1995; Amon *et al.*, 1993). Darüber hinaus befinden sich noch vier TCS-Elemente in der Promotorregion von *CLNI* (Abb. 7), dessen volle Expressionsstärke nur in Gegenwart von Tec1 erreicht wird. *TECI* selbst ist ebenfalls Zellzyklus-reguliert und erreicht seine volle Genexpressionsstärke schon zu Beginn der G1-Phase (Pramila *et al.*, 2006). Die stärkste Genexpression von *CLNI* begleitet und ermöglicht dagegen den Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus (Abb. 8). Sowohl *TECI* als auch *CLNI* werden in diploiden *S. cerevisiae*-Zellen für die Differenzierung zu pseudohyphalem Wachstum benötigt. Stämme mit Deletion eines dieser Gene können nicht mehr filamentös wachsen (Madhani *et al.*, 1999). Dass die Deletion von *TECI* nicht zu einem letalen Verlust der Zellzykluskontrolle führt, kann mit der Präsenz von Cln2 erklärt werden. Bis auf Cln3 liegen alle Zyklone in Paaren mit größtenteils redundanten Funktionen vor. Cln2 kann die essentiellen Funktionen von Cln1 übernehmen (Wittenberg *et al.*, 1990; Nasmyth, 1996 b).

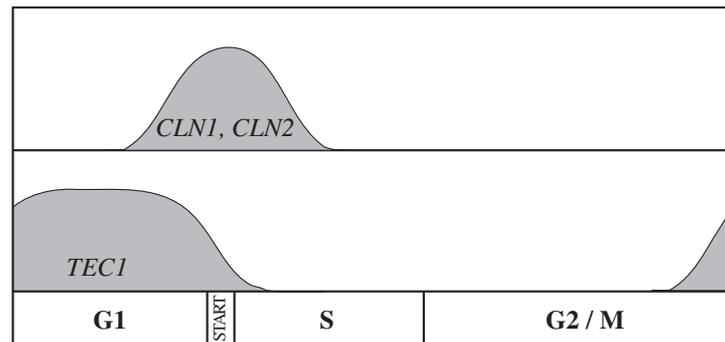


Abb. 8: Genexpression von *TEC1* und *CLN1* im Verlauf des Zellzyklus.

Die Zyklone treten für einen spezifischen Zeitraum des Zellzyklus auf. Sie bestimmen die Aktivität der Zyklin-abhängigen Kinase Cdc28. Ihre Regulation erfolgt über transkriptionelle Kontrolle und Zellzyklus-abhängige Proteolyse. Die Expression von *CLN1* wird durch den Transkriptionsfaktor Tec1 verstärkt. Er ist ebenfalls Zellzyklus-reguliert und erreicht seine maximale Genexpression zu Beginn der G1-Phase.

Tec1 als Regulator von *FLO11*: Die Fähigkeit zum haploid adhäsiven Wachstum oder in Diploiden zum Pseudohyphenwachstum setzt eine Vielzahl von Regulationen voraus. Vegetatives Wachstum erfolgt in haploiden Zellen durch axiale Sprossung, wobei die Zellteilung überwiegend am proximalen Zellpol, also nahe der Geburtsnarbe, erfolgt (Freifelder, 1960). Adhäsiv wachsende Zellen wechseln dagegen von axialer zu bipolarer Sprossung, was zu Filament-ähnlichen Strukturen führt (Gimeno *et al.*, 1992). Die Zell-Zell- und Zell-Substratadhäsion selbst wird durch die Expression von Zelloberflächenproteinen, den Flokkulinen und Adhäsinen, vermittelt. Dem Flokkulin Flo11 kommt dabei besondere Bedeutung zu, da es für adhäsives und Pseudohyphenwachstum (Lambrechts *et al.*, 1996; Lo und Dranginis, 1998), Zell-Substratadhäsion (Guo *et al.*, 2000) und die Fähigkeit zur Biofilmbildung (Reynolds und Fink, 2001) essentiell ist. Die Deletion von *FLO11* hat keine Konsequenzen für das vegetative Wachstum, die Zellen können aber weder adhäsiv wachsen noch Pseudohyphen bilden (Lo und Dranginis, 1998).

Das Oberflächenprotein Flo11 ist über Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) in der Zellmembran verankert und stark glykosyliert (Lo und Dranginis, 1996). Es enthält einen hydrophoben N-Terminus, der die Signalsequenz für den Sekretionsweg durch das endoplasmatische Retikulum enthält, eine hydrophile Serin/Threonin-reiche Region, die stark O-glykosyliert wird, und einen hydrophoben C-Terminus für den GPI-Anker (Caro *et al.*, 1997). Der Promotor von *FLO11* ist außerordentlich komplex reguliert und mit 2,8 kb der längste in *S. cerevisiae*. Sowohl Stickstoffmangel als auch Glukose- oder Aminosäuremangel regulieren *FLO11* über unterschiedliche Signalwege. Darunter befinden sich der Signaltransduktionsweg der generellen Kontrolle der Aminosäurebiosynthese (GAAC, "General amino acid control"), der Ras2/cAMP-Signalweg, das MAPK-Modul für adhäsives Wachstum und die Transkriptionsfaktoren

Tec1, Ste12, Flo8, Gcn4, Phd1, Msn1, Mss1, Nrg1, Rme1 und Sfl1 (Gimeno und Fink, 1994; Lo und Dranginis, 1998; Rupp *et al.*, 1999; Pan und Heitman, 2000; Kuchin *et al.*, 2002; Braus *et al.*, 2003). Jedoch genügt bereits die Deletion einzelner dieser Faktoren, um das adhäsive Wachstum komplett zu unterdrücken. Die Deletion von *TEC1* führt beispielsweise zu einem kompletten Verlust der Adhäsionsfähigkeit. Der Promotor von *FLO11* selbst enthält acht TCS-Elemente (Abb. 7), jedoch kontrolliert Tec1 auch andere Faktoren, die einen Einfluss auf die *FLO11*-Expression ausüben. Daher ist nicht ausreichend geklärt, ob bei dem Adhäsionsverlust der *tec1*-Deletion nicht auch indirekte Effekte eine Rolle spielen könnten. So finden sich in den Promotoren der Transkriptionsfaktoren Flo8 und Phd1 ebenfalls TCS-Elemente, die in einem *tec1*-Deletionsstamm nicht mehr aktiviert werden könnten (Köhler *et al.*, 2002). Dadurch würden Flo8 und Phd1 als Aktivatoren der *FLO11*-Genexpression ebenfalls ausfallen. Zudem wurde auch durch das G1-Zyklus Cln1, dessen Gen ebenfalls von Tec1 kontrolliert wird, in zwei Studien ein positiver Effekt auf die *FLO11*-Genexpression gezeigt (Loeb *et al.*, 1999; Madhani *et al.*, 1999).

1.3. Signaltransduktion und Regulation von Tec1

1.3.1 Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen

Der Begriff MAP-Kinase geht ursprünglich auf eine Insulin stimulierte Serin/Threonin-Kinase zurück, die ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein phosphorylieren konnte ("Microtubule-associated protein kinase"). Das Akronym wurde neu definiert, als festgestellt wurde, dass diese Kinase mit weiteren Mitogen-aktivierbaren Protein-Kinasen zu einer neuen Familie zusammengefasst werden kann. Als "Mitogen" wurde dabei eine große Bandbreite an Mitose-aktivierenden Signalen zusammengefasst (Sturgill und Ray, 1986; Rossomando *et al.*, 1988).

Das Prinzip der MAPK-Kaskaden ist hoch konserviert und in der gesamten eukaryotischen Domäne vertreten. Sie nehmen eine Schlüsselstellung bei der Transduktion äußerer Signale von der Zelloberfläche zum Kern ein. Dabei geben drei Protein-Kinasen ein Phosphorylierungssignal sequenziell weiter. Diese Phosphorylierung bewirkt eine deutliche Steigerung der katalytischen Aktivität der einzelnen Kinase, beispielsweise um den Faktor 5000 für ERK2 (Prowse und Lew, 2001), und mit jeder "Stufe" der Kaskade eine Verstärkung des Eingangssignals. Die Anordnung mehrerer Module hintereinander bietet überdies den Vorteil vielfältiger Regulationsmöglichkeiten. Das Ende dieser Kaskade bildet die MAPK, die auch als ERK ("Extracellular-signal-regulated kinase") bezeichnet wird. Sie wird von der im Signalweg über ihr stehenden MAPK-Kinase phosphoryliert (MAPKK), die ihrerseits durch eine vorgeschaltete MAPKK-Kinase (MAPKKK) aktiviert wird. Synonym werden auch die Begriffe MEK (MAPK/ERK-

Kinase) und MAP2K (MAP 2x Kinase), bzw. MEKK (MEK-Kinase) und MAP3K (MAP 3x Kinase) verwendet. Übergeordnete Regulatoren der MAPK-Kaskaden umfassen tri- und monomere G-Proteine, Zyklin-abhängige Protein-Kinasen sowie verschiedene Typen von Sensoren. Die Aktivierung der MAPK durch die assoziierte MAPKK erfolgt an einem Threonin-x-Tyrosin-Motiv (T-x-Y) durch zweifache Phosphorylierung. Ihre katalytische Aktivität steigt daraufhin stark an. Im Gegensatz zu den MAPKK sind die MAPK Serin/Threonin-Kinasen, die ihre Zielproteine an dem Aminosäuremotiv Serin/Threonin-Prolin (S/T-P) phosphorylieren. Teilweise gibt es zusätzlich zu diesem S/T-P-Motiv eine Präferenz für Leucin an der Position -1 und Prolin an den Positionen -2 oder -3 relativ zur phosphorylierten Aminosäure (Songyang *et al.*, 1996). Die aktivierten MAPK werden durch spezifische Phosphatasen wieder inaktiviert, die auch als MKP (MAPK-Phosphatasen) bezeichnet werden (Keyse, 2000).

In *S. cerevisiae* wurden insgesamt sechs MAPK beschrieben, die in Kaskade-Modulen unterschiedlicher Signalwege platziert sind (Gustin *et al.*, 1998):

- 1) Der Signalweg für Osmoregulation ("HOG pathway"): Die MAPK dieses Signaltransduktionsweges ist Hog1 ("High osmotic glycerol"). Die darüber liegende Kaskade rekrutiert sich aus den Kinasen Pbs2 (MAPKK), Ste11 oder Ssk2/22 (MAPKKK) und der PAK Ste20 ("p21-activated kinase"). Sie reguliert durch die Phosphorylierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren über 600 Gene und mit ihnen die intrazelluläre Ionenkonzentration und Teile des Zellzyklus (Brewster *et al.*, 1993; Hohmann 2002; Westfall *et al.*, 2004).
- 2) Der Signalweg für Zellwandintegrität ("Cell integrity pathway"): Die MAPK Slt2 wird von den redundanten MAPKK Mkk1 und Mkk2 (Irie *et al.*, 1993) und der MAPKKK Bck1 (Lee und Levin, 1992) kontrolliert. Die einleitende Kinase ist Pkc1. Zusammen regulieren sie essentielle Funktionen des Wachstums und der Zellwandorganisation in proliferierenden Zellen (Lee *et al.*, 1993). Slt2 wird über ein Phosphatasemodul direkt vom TOR-Komplex 1 reguliert (Torres *et al.*, 2002). Für diesen Signalweg wurde noch die MAPK-ähnliche Kinase Mlp1 beschrieben (Watanabe *et al.*, 1997).
- 3) Die sporulationsspezifische MAPK: Für diesen Signalweg wurde bisher kein vollständiges Kinase-Modul beschrieben. Die MAPK Smk1 wird durch die PAK-verwandte Kinase Sps1 aktiviert und reguliert dadurch die Organisation der Sporenzellwandsynthese (Krisak *et al.*, 1994; Iwamoto *et al.*, 2005). Eine MAPKK und MAPKKK wurde bislang nicht zugeordnet.
- 4) Die Signalwege für Pheromonantwort und adhäsives Wachstum: Da diese Signaltransduktionswege für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung sind, sollen sie im Folgenden detailliert vorgestellt werden (siehe 1.3.2.).

1.3.2 Signaltransduktionswege für Pheromonantwort und adhäsives Wachstum

Von allen MAPK-Kaskaden in *S. cerevisiae* sind die Signalwege für Pheromonantwort und adhäsives Wachstum am besten charakterisiert. Bisher wurde angenommen, dass es einen zweigeteilten Verlauf der Signalweiterleitung gibt: Die Konjugation zweier haploider Hefezellen unterschiedlichen Geschlechts erfordert die Wahrnehmung des Partners, den Arrest des Zellzyklus in G1 und einen direkten Zell-Zell-Kontakt, der über morphologische Veränderung der Zellen ("Shmooing") realisiert wird. Die Wahrnehmung des Sexualpartners erfolgt dabei über Sezernierung und Rezeption geschlechtsspezifischer Pheromone. Der α -Faktor wird von *MAT α* -Zellen gebildet und besteht aus einem Peptid aus 12 Aminosäuren, das kovalent mit einer Farnesyl-Gruppe verbunden ist. *MAT α* -Zellen sezernieren dagegen den 13 Aminosäure langen α -Faktor, der keine sekundären Modifikationen trägt. Das Pheromon des Partners wird durch geschlechtsspezifisch exprimierte Rezeptoren wahrgenommen. *MAT α* -Zellen bilden den α -Faktor-Rezeptor Ste2, *MAT α* -Zellen den α -Faktor-Rezeptor Ste3 (Naider und Becker, 2004). Die Bindung eines Peptid-Pheromons am richtigen Serpentin-Rezeptor führt zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins im Inneren der Zelle. Die α -Untereinheit Gpa1 dieses Proteins tauscht daraufhin gebundenes GDP gegen GTP aus und lockert ihre Verbindung zum $\beta\gamma$ -Heterodimer aus Ste18 und Ste4 (Klein *et al.*, 2000). Dieser über Ste18 an die Zytoplasmamembran gebundene Komplex bindet/aktiviert den Far1/Cdc24-Komplex (Nern und Arkowitz, 1999), die PAK Ste20 (Leeuw *et al.*, 1998) sowie den Verbund von Ste5 und Ste11 (Pryciak und Huntress, 1998). Der GDP/GTP-Austauschfaktor Cdc24 bewirkt nun bei der Rho-Typ-GTPase Cdc42 den Austausch von GDP zu GTP. Das führt zu einer Interaktion zwischen GTP-Cdc42 und der CRIB-Domäne der PAK Ste20, deren Autophosphorylierung bislang von ihrer ungebundenen CRIB-Domäne verhindert wurde (Ash *et al.*, 2003). Durch das ebenfalls von Ste4 rekrutierte "Scaffold"-Protein Ste5 kommt die MAPKKK Ste11 in unmittelbarer räumlicher Nähe zur nunmehr aktivierten PAK Ste20 und wird von dieser phosphoryliert. Dieses Phosphorylierungssignal wird über die MAPKK Ste7 an die MAPK Fus3 weiter gegeben (Bardwell, 2004). Fus3 phosphoryliert den Transkriptionsfaktor Ste12 und die Ste12-Inhibitoren Dig1 und Dig2 und entlässt sie aus ihrem deaktivierenden Verbund (Bardwell *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1997). Durch Ste12 wird die PRE-vermittelte Transkription von Zielgenen wie dem Gen des Agglutinins Fus1 oder des Transkriptionsfaktor Tec1 aktiviert. Gleichzeitig phosphoryliert Fus3 den Zellzyklusinhibitor Far1, der daraufhin im Nukleus den Komplex aus Cdc28 und Cln1 bindet und deaktiviert (Peter und Herskowitz, 1994). Die Folge ist ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Abb. 9, linke Hälfte). Dieser Signaltransduktionsweg der Pheromonantwort teilt sich verschiedene Komponenten mit dem Signalweg für adhäsives Wachstum. Es wird angenommen, dass anstelle eines heterotrimeren G-Proteins das GTP-bindende Protein Ras2 die distale Aktivierung des Weges übernimmt. Das Signal und der Weg der Signaltransduktion für die Aktivierung

von Ras2 sind nicht genau bekannt, angenommen wird eine Verschlechterung des Nährstoffangebots, insbesondere eine Limitierung der Glukoseversorgung (Cullen und Sprague, 2000). Ob Ras2 den GDP/GTP-Austauschfaktor Cdc24 aktiviert, der Cdc42 in seine GTP-gebundene Form versetzt, ist nicht bekannt.

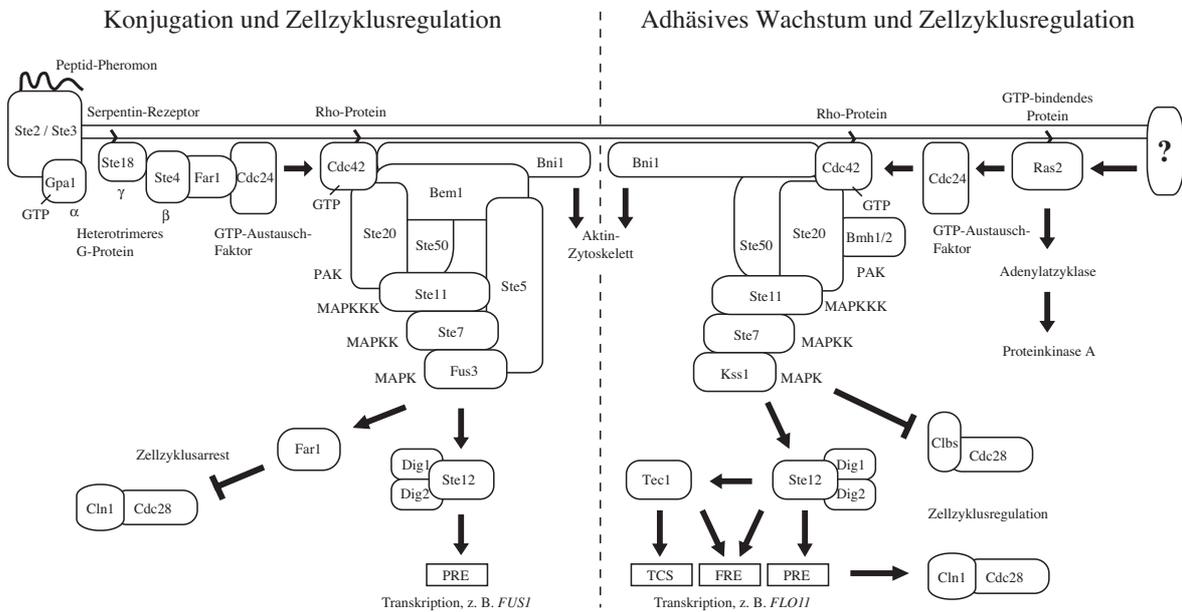


Abb. 9: Signaltransduktionskaskaden des adhäsiven Wachstums und der Konjugation.

Das Modell zeigt eine Gegenüberstellung der wichtigsten Faktoren beider Signalwege. Die zentralen MAPK-Module um Fus3 und Kss1 teilen sich mehrere vorgeschaltete Komponenten. Die aktivierenden Signale für adhäsives Wachstum sind nicht im Detail bekannt. Ihre Vermittlung durch Ras2 führt sowohl zu einer Aktivierung des Ras2/cAMP-Signalweges als auch der MAPK-Kaskade mit Kss1 als terminaler Kinase. Der Transkriptionsfaktor Ste12 wird sowohl von Fus3 als auch von Kss1 aktiviert.

Wie bereits zuvor beschrieben, interagiert Cdc42 mit der PAK Ste20 und aktiviert sie. Dazu werden in diesem Signalweg noch die paraloge Proteine Bmh1 und Bmh2 benötigt. Sie gehören zu der Familie der 14-3-3-Proteine, binden Ste20 *in vivo* und sind für das filamentöse Wachstum essentiell (Roberts *et al.*, 1997). Als zusätzliches Adapterprotein vermittelt Ste50 durch seine Interaktion sowohl mit Cdc42 als auch mit Ste11 die räumliche Nähe der MAPKKK zu Ste20 (Ramezani Rad *et al.*, 1998). Dadurch wird die sequenzielle Phosphorylierung von Ste11, Ste7 und Kss1, der terminalen MAPK dieses Signalweges, ermöglicht. Im inaktiven Zustand bindet Kss1 ebenso wie Fus3 den Transkriptionsfaktor Ste12 und die Proteine Dig1 und Dig2 zu einem inhibitorischen Komplex. Durch die Phosphorylierung von Kss1 wird dieser Verbund gelöst und Ste12 aktiv (Bardwell *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1996; Hung *et al.*, 1997). Damit kann die PRE-vermittelte Transkription im Promotor von *TEC1* aktiviert werden und der neu gebildete

Transkriptionsfaktor seine eigene Transkription autoregulatorisch über TCS-Elemente verstärken (Madhani und Fink, 1997). Tec1 kann dann seine Zielgene über TCS-Kontrolle oder zusammen mit Ste12 an FRE-Elementen aktivieren (Köhler *et al.*, 2002; Madhani und Fink, 1997). Die Transkription von *FLO11* wird so aktiviert und adhäsives Wachstum ermöglicht (Abb. 9, rechte Hälfte).

Die MAPK Fus3 und Kss1 sind partiell redundant. Beide werden von Ste7 phosphoryliert, und beide kontrollieren den Ste12/Dig1/Dig2-Komplex (Bardwell *et al.*, 1998; Cook *et al.*, 1996; Errede *et al.*, 1993; Hung *et al.*, 1997). Sie können auch beide vom "Scaffold"-Protein Ste5 gebunden werden, Fus3 jedoch mit höherer Affinität als Kss1. Ste5 stellt so die gerichtete Weiterleitung der Signale sicher. Eine Mutation in der Ste7-Bindestelle von Ste5 führt zu einer vermehrten Freisetzung von phosphoryliertem Ste7 und dadurch zu einer Aktivierung von Kss1 nach einem Pheromonsignal (Schwartz und Madhani, 2006).

1.4. Der TOR-Signalweg

In *S. cerevisiae* gibt es zwei paraloge Serin/Threonin-Kinasen, die mit den Akronymen TOR1 und TOR2 ("Target of Rapamycin") benannt wurden. Sie bilden zwei distinkte Komplexe, TORC1 und TORC2 (TORC1/2), von denen einer, TORC1, durch Rapamycin blockiert werden kann (Heitman *et al.*, 1991). Dieses lipophile Makrolid wurde 1975 aus dem Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus* isoliert, welches einer Bodenprobe von den Osterinseln entstammte. In Anlehnung an diese Inseln, deren polynesischer Name "Rapa Nui" ist, erfolgte die Benennung des Stoffes. Zunächst als Antimykotikum verwendet, stellte sich schnell heraus, dass der Stoff immunsupprimierende Wirkung besitzt und gegen bestimmte Tumorerkrankungen eingesetzt werden kann.

Das TOR-System ist in eukaryotischen Organismen hochkonserviert, wobei die meisten Organismen nur eine TOR-Kinase besitzen. In *S. cerevisiae* existieren dagegen zwei Proteine dieser Art. Sie sind zu 67% identisch und ähneln den Phosphatidylinositol-Kinasen (Cafferkey *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 1993), weshalb sie zu der Familie der Phosphatidylinositol-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK) gezählt werden (Keith und Schreiber, 1995). Die von ihnen gebildeten TOR-Komplexe 1 und 2 beeinflussen direkt oder über weitere Kinasen und Phosphatasemodule ein weit verzweigtes System von Signalwegen (Abb. 10).

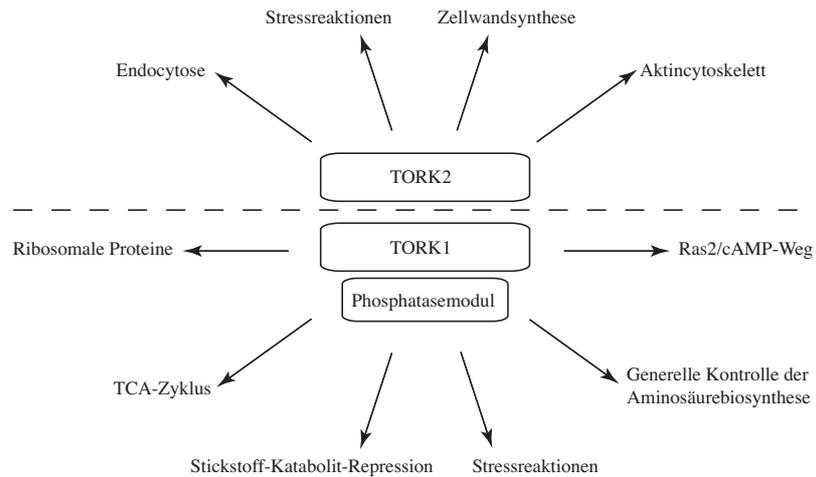


Abb. 10: Die TOR-abhängige Signaltransduktion.

Die beiden TOR-Kinasen aus *S. cerevisiae* kontrollieren direkt oder indirekt eine Vielzahl von zellulären Prozessen. Sie bilden die zwei distinkten Komplexe TORK1 und TORK2 mit voneinander unabhängigen Regulationszielen. Der TORK1 beeinflusst die meisten seiner Zielproteine über ein System von Phosphatasemodulen.

1.4.1 Die TOR-Komplexe 1 und 2

Der Mechanismus der TORK1-Blockierung durch Rapamycin ist nicht restlos aufgeklärt: *FPR1* kodiert in *S. cerevisiae* für die Isomerase FKBP12, die auch als FK506-Bindeprotein bezeichnet wird. FK506 ist ein mit Rapamycin strukturell verwandtes Immunsuppressivum mit ähnlicher, aber nicht identischer Wirkung. Beide binden FKBP12 und blockieren dessen Isomeraseaktivität, was die zytostatische Wirkung der Substanzen aber nicht erklärt, denn eine *fpr1*-Deletion bleibt ohne Effekt (Heitman *et al.*, 1991; Koltin *et al.*, 1991). Der Komplex aus FKBP12 und Rapamycin kann jedoch mit allen Komponenten des TORK1 co-präzipitiert werden und blockiert dessen Aktivität auf nicht abschließend untersuchte Art und Weise (Loewith *et al.*, 2002). Die Bindung erfolgt über einen Bereich in den TOR-Proteinen, der als FKBP12-Rapamycin-Bindedomäne (FRB) bezeichnet wird.

Der TOR-Komplex 1: Der TORK1 besteht aus den Proteinen Lst8, Kog1, Tco89 und Tor1 oder Tor2 (Loewith *et al.*, 2002; Reinke *et al.*, 2004). Wahrscheinlich bildet er über die TOR-Kinase ein Dimer (Loewith *et al.*, 2002; Wullschleger *et al.*, 2005) und befindet sich hauptsächlich an der Zytoplasma- und der Vakuolenmembran (Cardenas und Heitman, 1995; Kunz *et al.*, 2000; Wedaman *et al.*, 2003). Seine Lokalisation wird von Rapamycin nicht beeinflusst (Chen und Kaiser, 2003; Kunz *et al.*, 2000).

Lst8 ist ein essentielles Protein, welches nicht ausschließlich in den TOR-Komplexen, sondern unabhängig davon auch in der Sekretionskontrolle von Aminosäure-Permeasen eine Rolle spielt. Wahrscheinlich ist es für die Interaktion des TORK1 mit nachgelagerten

Effektoren nötig (Chen und Kaiser, 2003; Liu *et al.*, 2001; Roberg *et al.*, 1997). Kog1 ist ebenfalls essentiell und von nicht vollständig geklärter Funktion. Es verfügt über vier HEAT-Domänen (gefunden in: "Huntington disease protein", "Elongation factor 3", Untereinheit A der Protein Phosphatase 2A und TOR) und sieben WD-40-Domänen und könnte wie sein Ortholog Raptor aus Säugetieren die Aufgabe eines "Scaffold"-Proteins für TOR-Substrate erfüllen (Hara *et al.*, 2002). Die letzte Komponente aus TORC1 ist das nicht essentielle Tco89. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Proteinen ist es nur innerhalb des Reiches der Pilze konserviert. Die Deletion von *TCO89* führt zu gesteigerter Sensitivität gegenüber Rapamycin und Koffein und ist zusammen mit einer *tor1*-Deletion synthetisch letal (Reinke *et al.*, 2004). Die TOR-Kinasen selbst sind ca. 280 kDa groß und verfügen über eine Vielzahl von Proteinmotiven. Beginnend am N-Terminus sind 20 Sequenzwiederholungen des HEAT-Motivs hintereinander platziert. Sie werden wahrscheinlich für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen benötigt (Andrade und Bork, 1995; Andrade *et al.*, 2001). Die folgende FAT-Domäne hat möglicherweise die Funktion eines "Scaffolds" und findet sich in allen PIKKs (Bosotti *et al.*, 2000). Sie tritt immer zusammen mit der kleineren, für die TOR-Funktionen essentiellen FATC-Domäne am äußersten C-Terminus des Proteins auf. Zwischen FAT- und FATC-Domäne liegen die FRB- und die Kinase-Domäne. Entgegen ihrer Verwandtschaft zu den PIKKs wurde bislang keine Lipid-Kinase-Aktivität für Tor1/2 nachgewiesen. Beide agieren als Serin/Threonin-Kinase (Zheng *et al.*, 1995).

Der TOR-Komplex 2: Der TORC2 besteht aus Lst8, Avo1, Avo2, Tsc11, Bit61 und Tor2. Tor1 kann Tor2 in dieser Funktion nicht ersetzen (Fadri *et al.*, 2005; Loewith *et al.*, 2002; Wedaman *et al.*, 2003). Auch der TORC2 bildet ein Dimer (Wullschleger *et al.*, 2005), kann aber nicht durch den FKBP12-Rapamycin-Komplex inhibiert werden. Möglicherweise ist die FRB-Domäne nicht zugänglich (Loewith *et al.*, 2002). Die Lokalisation konnte bislang nur indirekt über die TORC2-Substrate Slm1 und Slm2 nachgewiesen werden. Demnach befindet sich der TORC2 an distinkten Punkten der Plasmamembran (Audhya *et al.*, 2004). Er ist nicht durch Rapamycin beeinflussbar und ist an der Regulation der Zellpolarität, des Aktinzytoskeletts und der Meiose beteiligt.

Obwohl sich die TOR-Kinasen strukturell und sequenziell stark ähneln, sind sie funktionell nicht identisch. Der TORC2 kann nur mit Tor2 gebildet werden. Der Verlust von Tor1 macht die Hefezellen hypersensitiv gegenüber Temperaturextremen und osmotischem Stress (Crespo *et al.*, 2001; Helliwell *et al.*, 1994). Der Verlust von Tor2 ist in Folge eines ungeordneten Zellzyklusarrests letal. Schaltet man beide TOR-Kinasen aus, was für den Organismus natürlich ebenso letal ist, erfolgt dieser Arrest in G1/G0 des Zellzyklus (Helliwell *et al.*, 1998; Kunz *et al.*, 1993).

Regulation des TOR-Komplexes 1: Die wichtigsten Herausforderungen für die Hefezelle sind die Sicherstellung der Nährstoffversorgung und die protektive Reaktion auf schädliche Umweltreize. Auf beide Signalarten, Nährstoffversorgung und Stress, reagiert der TORC1.

Dabei liegen die Mechanismen der Wahrnehmung des Reizes und der Kommunikation von und zum TORK1 weitestgehend im Dunkeln. Stickstoffmangel und/oder die mangelnde Versorgung mit verwertbaren Kohlenstoffquellen führen zu einem vergleichbaren Phänotyp wie die Applikation von subletalen Dosen Rapamycin. Die Zellen arretieren nach einigen Stunden in der G₀-Phase des Zellzyklus und weisen stark vergrößerte Vakuolen auf (Barbet *et al.*, 1996; Cardenas und Heitman, 1995; Heitman *et al.*, 1991). Weitere Untersuchungen erhärteten den Verdacht, dass TOR die Signaltransduktion der Nährstoffversorgung kontrolliert und Rapamycin zelluläre Programme initiiert, die normalerweise als Reaktion auf eine Unterversorgung abgerufen werden (Barbet *et al.*, 1996; Cardenas *et al.*, 1999; Hardwick *et al.*, 1999). In Mammalia wurden bestimmte Aminosäuren, wie z. B. Leucin und Glutamin, der intrazelluläre ATP-Spiegel und anorganische Polyphosphate als mögliche Regulatoren der mTOR-Aktivität ermittelt (Dennis *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2002). Glutamin scheint auch in *S. cerevisiae* eine Funktion bei der TOR-Regulation zu haben. Seine zentrale Funktion im Zellmetabolismus macht es zu einem guten Indikator für den generellen Versorgungszustand der Zelle (Crespo *et al.*, 2002; Magasanik und Kaiser, 2002; Peng *et al.*, 2002). Neben der extrazellulären Nährstoffversorgung kann die Zelle auch auf ein internes Reservoir zurückgreifen, die Vakuole. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass ein Proteinkomplex in der Vakuolenmembran namens EGOC ("Exit from rapamycin-induced growth arrest complex") in der Lage ist, Nährstoffsignale an TORK1 zu vermitteln. Eine Überexpression der EGOC-Komponenten führt zu einer verstärkten Toleranz gegenüber Rapamycin (Dubouloz *et al.*, 2005).

Die Regulation von TORK1 durch Stresseinflüsse ist nicht weniger deutlich als durch Nährstoffe, wird in *S. cerevisiae* aber noch schlechter verstanden. In mehreren Genom-weiten Studien konnte ein hemmender Einfluss von TORK1 auf verschiedene Stress-regulierte Transkriptionsfaktoren belegt werden (Cardenas *et al.*, 1999; Chen und Powers, 2006; Shamji *et al.*, 2000). In Mammalia wird die Aktivität von mTORK1 durch die "AMP-activated protein kinase" (AMPK) über die Phosphorylierung der TORK1-Komponente Tsc2 inhibiert, nachdem diese durch Stressbedingungen aktiviert wurde. Für das AMPK-Ortholog Snf1 in *S. cerevisiae* konnte aber bislang keine regulierende Wirkung auf TORK1 nachgewiesen werden. Der Mechanismus müsste sich zudem von dem im Menschen unterscheiden, da es kein Ortholog für Tsc2 in *S. cerevisiae* gibt (Wullschleger *et al.*, 2006).

Regulation des TOR-Komplexes 2: Für TORK2 wird ähnlich wie für TORK1 eine Regulation durch Nährstoffangebot und Stresseinflüsse vermutet. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der transienten Aktin-Depolymerisation unter verschiedenen Stressbedingungen und TORK2 (Beck *et al.*, 2001). Wie diese Signale wahrgenommen und an TORK2 vermittelt werden könnten, ist jedoch unbekannt. Deutliche Hinweise gibt es hingegen, dass TORK2 als Regulator der Zellpolarität (Loewith *et al.*, 2002) und der

Endozytose (deHart *et al.*, 2003) fungiert sowie die Calcineurin-Aktivität hemmt (Martin *et al.*, 2004). In *Schizosaccharomyces pombe* wurde zudem ein Einfluss des AVO1-Homologs *SINI* auf die Stress-aktivierte MAPK Sty1/Sp1 entdeckt (Wilkinson *et al.*, 1999). Die Rezeptorsysteme oberhalb von TORK2 und die Mechanismen der Übertragung zum TORK2 sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bekannt.

1.4.2 TORK1-abhängige Signaltransduktionswege

TORK1 fördert anabolische Prozesse wie die Initiation der Translation, die Ribosomen-Biosynthese, den mRNA-Umsatz und die Aktivierung von Aminosäure-Permeasen. Auf der anderen Seite werden katabolische Prozesse wie Autophagie oder die transkriptionelle Reaktion auf Stresssignale blockiert (De Virgilio und Loewith, 2006). Prinzipiell lassen sich dabei zwei Kategorien von TORK1-regulierten Signalwegen unterscheiden: Zum einen Signalwege, die direkt vom TORK1 beeinflusst werden, und zum anderen Signalwege, die von Tap42-gesteuerten Phosphatasemodulen abhängig sind. Diese Einteilung gilt jedoch nicht ohne Überschneidungen. Die Initiation der Translation wird beispielsweise durch Signalwege beider Kategorien beeinflusst.

1.4.2.1 TORK1-kontrollierte Phosphatasemodule

Der überwiegende Teil der Regulationen, die durch den TORK1 vermittelt werden, erfolgt über Module der Protein-Phosphatase 2A (PP2A) oder PP2A-verwandter Phosphatasen. Deren Kontrolle wird wahrscheinlich über die Proteine Tip41 und Tap42 direkt vom TORK1 vermittelt (Abb. 11) (Jiang und Broach, 1999). Die PP2A besteht aus einer von drei möglichen katalytischen Untereinheiten (PP2Ac), die mit einer von zwei möglichen regulatorischen Untereinheiten (B oder B') über das "Scaffold"-Protein Tpd3 (A) verbunden sind (Groves *et al.*, 1999). Die PP2Ac-Proteine Pph21 und Pph22 sind redundant, während Pph3 nur wenig gemeinsame Funktionen mit ihnen zu haben scheint. Ihre Spezifität wird von den zwei regulatorischen Untereinheiten Cdc55 und Rts1 diktiert, die praktisch keine funktionellen Überschneidungen zeigen. Das Pph21/22-Homolog Sit4 ist die PP2A-verwandte Phosphatase, die am TORK1-Signalweg beteiligt ist. Stämme mit dem Temperatur-sensitiven Allel *sit4-102* arretieren bei restriktiver Temperatur in der G1-Phase des Zellzyklus, dem terminalen Phänotyp nach Applikation von Rapamycin (Sutton *et al.*, 1991). An der Kontrolle von Sit4 sind zusätzlich die regulatorischen Untereinheiten Sap4, Sap155, Sap185 und Sap190 ("Sit4 associated protein") beteiligt. Sap155/185/190 haben teilweise überschneidende Funktion und interagieren Zellzyklus-abhängig mit Sit4. Die Deletion einer dieser drei SAPs hat praktisch keine Auswirkungen, die Dreifach-Mutante zeigt dagegen einen Phänotyp ähnlich dem einer *sit4Δ*-Mutante (Luke *et al.*,

1996). Das vierte SAP, Sap4, wurde über seine Sequenzhomologie zu den vorangegangenen entdeckt. Seine Funktion ist noch ungeklärt.

Die Annahme, dass die PP2A und die PP2A-verwandte Phosphatase Sit4 an der TORK1-abhängigen Signaltransduktion beteiligt sind, rührt von der Identifikation von Tap42 als PP2Ac- und Sit4-bindendes Protein her. Das Protein Tap42 wird abhängig von der Nährstoffversorgung direkt von TORK1 phosphoryliert. Es bildet dann unabhängig von den regulatorischen Untereinheiten, dem "Scaffold"-Protein oder den SAPs, einen Komplex mit PP2Ac-Rrd2 oder Sit4-Rrd1 und inhibiert deren Phosphataseaktivität (Abb. 11) (Di Como und Arndt, 1996; Jiang und Broach, 1999; Zheng und Jiang, 2005).

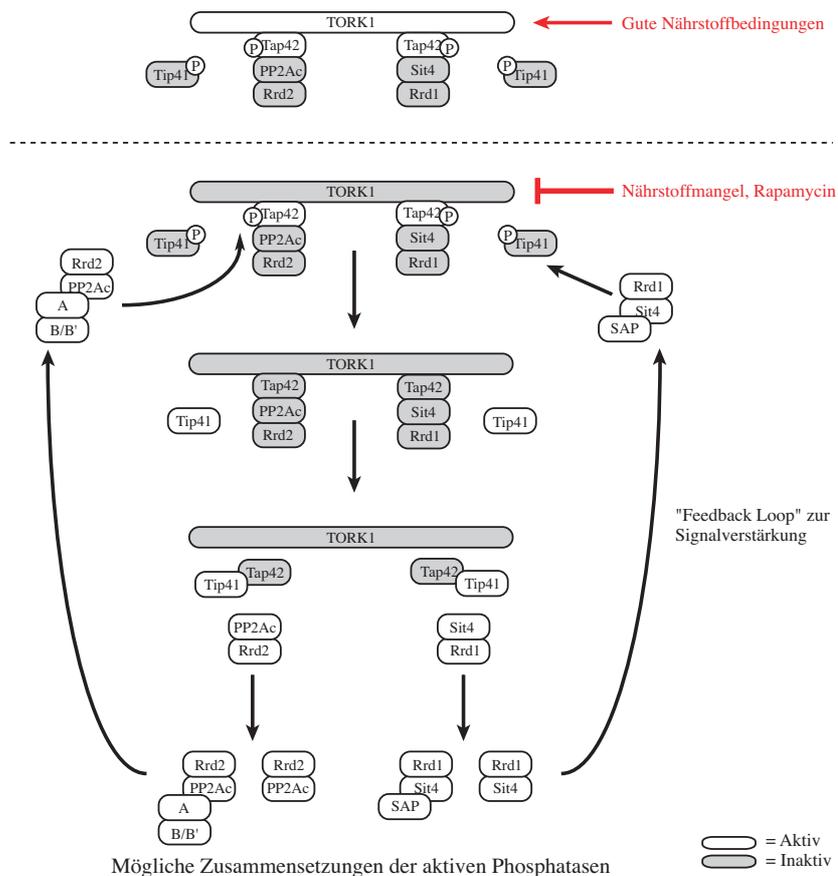


Abb. 11: TORK1-kontrollierte Phosphatasemodule.

Der TORK1 inhibiert bei guter Nährstoffversorgung über Tap42 die PP2A und PP2A-ähnliche Phosphatasemodule (oberer Teil der Abb.). Wird der TORK1 durch Nährstoffmangel oder Rapamycin inaktiviert, erfolgt die Aktivierung der Phosphatasemodule (dargestellt als dynamisches Modell in drei Schritten im unteren Teil der Abb.). TORK1 = TOR-Komplex 1, Tap42 = Phosphatase-assoziiertes Protein, Tip41 = Tap42-Regulatorprotein, PP2Ac = katalytische Untereinheit der PP2A, Sit4 = PPA2-verwandte Phosphatase, Rrd1 = Aktivator der PP2A-verwandten Phosphatase, Rrd2 = Aktivator der PP2A, A = "Scaffold"-Protein der PP2A, B/B' = Regulatorische Untereinheit der PP2A, SAP = Sit4-assoziierte Proteine, P = Phosphat.

Die Deletion von *TAP42* ist für die Zelle letal; die Regulation des Proteins erfolgt außer über die Phosphorylierung durch TORK1 mit Hilfe einer Bindung des Proteins Tip41

("Tap42 interacting protein"). Aktiviertes Sit4 dephosphoryliert eine Reihe von TOR-Effektor-Proteinen, darunter auch Tip41 und Tap42. Ist der TORK1 aktiv, werden beide phosphoryliert. Wird er durch Zugabe von Rapamycin blockiert, liegen Tip41 und Tap42 überwiegend dephosphoryliert vor, was mit einer verstärkten Assoziation beider Proteine einhergeht (Jacinto *et al.*, 2001). Nicht-phosphoryliertes Tip41 bindet nicht-phosphoryliertes Tap42 und fördert so seine Dissoziation von Sit4-Rrd1 und PP2Ac-Rrd2. Diese Aktivierung in Folge der Tap42-Dephosphorylierung kann durch eine *tip41*-Deletion supprimiert werden (Santhanam *et al.*, 2004). Der Phosphorylierungsstatus von Tip41 und Tap42 sowie deren Interaktion korreliert also mit der Substratspezifität der assoziierten Phosphatasemodule (Duvel *et al.*, 2003; Van Hoof *et al.*, 2005; Zheng und Jiang, 2005). Es handelt sich um einen "Feedback"-Mechanismus, der unter TOR-inhibierenden Bedingungen die Aktivität der Phosphatasemodule steigert. Die Rolle der Rrd1/2-Proteine ist dabei noch nicht geklärt. Ob die Komplexe aus Tap42-PP2Ac-Rrd2 und dem normalen ABC-Komplex der PP2A oder aus Tap42-Sit4-Rrd1 und dem Sit4/SAP-Verbund für die TORK1-vermittelte Signaltransduktion in funktionellem Zusammenhang stehen, ist nicht bekannt. Alle vier Module existieren zeitgleich, wobei nur ca. 10% von PP2Ac oder Sit4 mit Tap42 assoziiert sind (Di Como und Arndt, 1996). Nach dem derzeitigen Modell reguliert TORK1 die Tap42-assoziierten Phosphatasen durch direkte Interaktion und hält sie an der Membran fest. Die Inaktivierung von TORK1 durch Rapamycin oder Nährstoffmangel ermöglicht nach Dephosphorylierung von Tap42 die Freisetzung der Phosphatasemodule ins Zytoplasma. Dort sind sie aktiv, bis Tap42 wahrscheinlich durch die heterotrimere PP2A dephosphoryliert wird (Yan *et al.*, 2006).

1.4.2.2 Der Ras2 / cAMP-Signalweg

Der Ras2 / cAMP-Signalweg ist einer der Hauptregulatoren bei der Verarbeitung Nährstoff-bedingter Einflüsse. Es kann unter den entsprechenden Bedingungen durch Glukose, Ammonium, Aminosäuren und Phosphate aktiviert werden (Abb. 12) (Thevelein *et al.*, 2005). Bei der Kontrolle der für das adhäsive Wachstum entscheidenden Expression von *FLO11* agiert der Ras2/cAMP-Weg parallel zu den MAPK Fus3 und Kss1. Beide Signalwege können durch Ras2 aktiviert werden (Mösch *et al.*, 1999). Er ist mit anderen Nährstoff-regulierten Kinasen wie Rim15 und Yak1 vernetzt (Thevelein und de Winde, 1999) und wahrscheinlich funktionell mit TORK1 verbunden (Beck und Hall, 1999; Cutler *et al.*, 2001; Schmelzle *et al.*, 2004). Dabei scheint der Ras2/cAMP-Signalweg unabhängig von Tap42 und den Phosphatasemodulen von TORK1 beeinflusst zu werden. Tap42, PP2A und Sit4 beeinflussen die TORK1-vermittelte Regulation dieses Weges nicht. Dennoch kann der TORK1 den Ras2/cAMP-Signalweg beeinflussen. Gestützt wird diese Annahme unter anderem durch eine partielle Resistenz gegenüber Rapamycin, welche durch die konstitutive Aktivierung des Ras2/cAMP-Signalweges vermittelt wird: Die normalerweise

zu beobachtende Translokation des Transkriptionsfaktors Msn2 und damit die Aktivierung von Stress-induzierten Genen, die Induktion der Autophagie und die Inhibierung der Ribosomenproduktion finden unter diesen Bedingungen nicht mehr statt. Zudem kontrolliert TORK1 die Lokalisation der katalytischen Untereinheit Tpk1 der Protein-Kinase A (PKA) und der Kinase Yak1 (Schmelzle *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae* wird die Adenylatzyklase Cyr1 unter anderem von einem G-Protein-gekoppelten Rezeptorsystem aus Gpr1 und Gpa2 und dem GTP-bindenden Protein Ras2 aktiviert (Colombo *et al.*, 1998; Kraakman *et al.*, 1999). Sie produziert daraufhin cAMP, welches durch die Bindung an die inhibitorische Untereinheit Bcy1 die PKA aktiviert (Toda *et al.*, 1985).

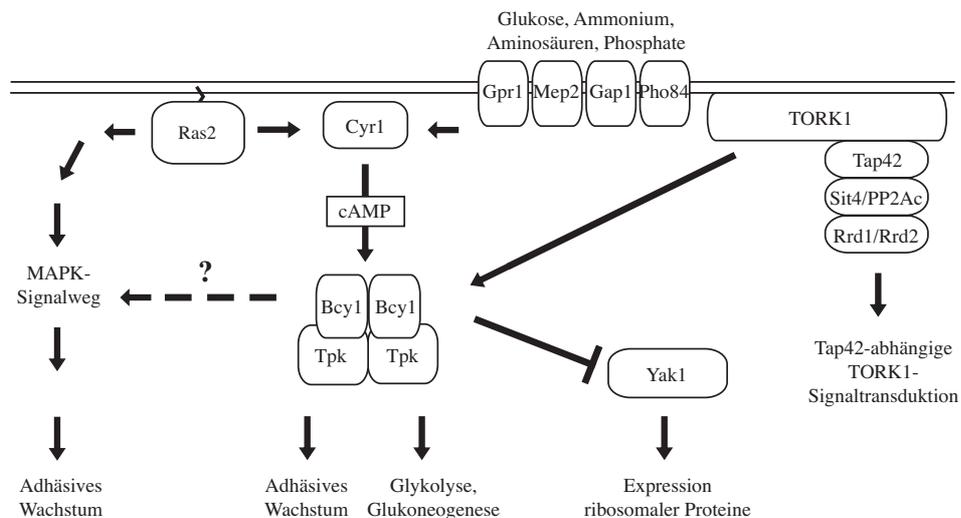


Abb. 12: Der Ras2/cAMP-Signalweg wird von TORK1 beeinflusst.

Verschiedene Nährstoffsensoren regulieren die Adenylatzyklase. Die PKA wird von dem dadurch ansteigenden cAMP-Spiegel aktiviert. Der TORK1 scheint unabhängig von seinen Phosphatase-Modulen die PKA zu beeinflussen. Er kontrolliert unter anderem die Lokalisation von Tpk1 und der Kinase Yak1. Eine Quervernetzung des Informationsflusses mit dem MAPK-Signaltransduktionsweg des adhäsiven Wachstums wird vermutet, ist aber nicht eindeutig belegt.

Das dominant aktive Ras2^{Val19} führt auch in Abwesenheit eines aktivierenden Nährstoffsignals zu einer konstitutiven Aktivierung der Adenylatzyklase und somit z. B. zu starkem adhäsivem Wachstum. Eine Überexpression der Phosphodiesterase Pde2 supprimiert diesen Effekt (Ward *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite kann die Deletion von RAS2 oder GPA2 teilweise durch exogenes cAMP komplementiert werden (Kübler *et al.*, 1997; Lorenz und Heitman, 1997). Die PKA besteht aus jeweils einem Dimer der regulatorischen Untereinheit Bcy1 und einem Dimer einer der drei katalytischen Untereinheiten Tpk1, -2 oder -3, bildet also ein Heterotetramer. Durch die Bindung des cAMP an Bcy1 trennen sich beide Dimerpaare, und die katalytischen Untereinheiten dissoziieren und werden aktiv (Cannon und Tatchell, 1987). Sie sind in ihrer vitalen Funktion redundant (Toda *et al.*, 1987), aber nur Tpk2 hat einen positiven Einfluss auf das

filamentöse Wachstum (Robertson *et al.*, 2000; Robertson und Fink, 1998). Tpk1 und -3 scheinen dagegen die Produktion des cAMP über einen "Feedback Loop" zu stören (Pan und Heitman, 1999). Zu den Zielproteinen der PKA gehören die Transkriptionsfaktoren Flo8 und Sfl1, wobei Flo8 die Transkription von *FLO11* aktiviert (Pan und Heitman, 1999; Rupp *et al.*, 1999) während Sfl1 sie inhibiert (Robertson und Fink, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit besonders interessant ist eine mögliche Quervernetzung der PKA mit dem MAPK-Signalweg für adhäsives Wachstum. So kann die PKA unabhängig von der PAK Ste20 (und daher bei inaktivierter MAPK-Kaskade), aber abhängig von Ste12 und Tec1 ein FRE-Reporterkonstrukt aktivieren (Mösch *et al.*, 1999). Der zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch unbekannt.

1.4.2.3 Stickstoff-Katabolit-Repression und Steuerung von Aminosäure-Permeasen

Um sich mit Nährstoffen zu versorgen, hat *S. cerevisiae* im Laufe der Evolution eine große Anzahl mehr oder weniger spezialisierter Transportsysteme entwickelt. Die Expression dieser Systeme ist abhängig von den zur Verfügung stehenden Ressourcen. Bei gutem Nährstoffangebot werden eher spezialisierte Transporter gebildet, unter Mangelbedingungen dagegen solche mit breitem Substratspektrum und hoher Kapazität (Magasanik und Kaiser, 2002; Ozcan und Johnston, 1999). Nicht benötigte Transportsysteme werden ubiquitiniert und durch Endozytose ihrer Degradation in der Vakuole zugeführt (Helliwell *et al.*, 2001; Schmelzle *et al.*, 2004). Schlechte Stickstoff- und/oder Aminosäureversorgung inaktiviert den TORK1 und führt über die Aufhebung der Inhibition durch Tap42 zu einer Aktivierung der PP2A-verwandten Phosphatase Sit4 (Abb. 11). Diese sorgt mit Hilfe ihrer regulatorischen Untereinheiten, den SAPs, für die Dephosphorylierung spezifischer Substrate, darunter auch die Protein-Kinase Npr1 und der Transkriptionsfaktor Gln3. Npr1 wird TORK1-abhängig phosphoryliert/deaktiviert und durch Sit4/SAP dephosphoryliert/aktiviert (Schmidt *et al.*, 1998). Sie reguliert den allgemeinen Aminosäuretransporter Gap1 sowie die Tryptophan/Tyrosin-Permease Tat2. Bei inaktivem TORK1 und damit aktivem Npr1 wird Gap1 als Transporter geringerer Spezifität durch Phosphorylierung vor Ubiquitinierung und Abbau geschützt. Der Transporter mit dem geringeren Substratspektrum, Tat2, wird dagegen mit Ubiquitin zur Degradation markiert (Beck *et al.*, 1999 b; De Craene *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1998). Dies geschieht bei beiden Permeasen durch die E3-Ubiquitinligase Rsp5. Sie ist zusammen mit den Ubiquitin-bindenden Proteinen Bul1 und Bul2 für die Ubiquitinierung und damit für den Transport zur und den Abbau in der Vakuole verantwortlich (Helliwell *et al.*, 2001; Soetens *et al.*, 2001). Aminosäure-Permeasen niedriger Spezifität wie Gap1 und Mep2 unterliegen transkriptionell der Stickstoff-Katabolit-Repression ("Nitrogen catabolite repression", NCR). TORK1 blockiert die Translokation der GATA-Transkriptionsfaktoren Gln3 und Gat1 vom Zytoplasma in den Zellkern und verhindert unter guten

Nährstoffbedingungen die Expression der allgemeinen Transporter. Phosphoryliertes Gln3 wird dabei von dem ebenfalls phosphorylierten transkriptionalen Corepressor Ure2 gebunden (Abb. 13) (Beck und Hall, 1999; Cox *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 2000). Ein *ure2*-Deletionsstamm reagiert deutlich sensitiver auf Rapamycin (Rai und Cooper, 2005) und die Regulation durch die Stickstoff-Katabolit-Repression funktioniert nicht mehr. Die Zellen nutzen nun auch in Gegenwart guter Stickstoffquellen die schlechteren (Coschigano und Magasanik, 1991; Courchesne und Magasanik, 1988). Ein Zusammenhang zwischen Npr1-Aktivierung, dem Rsp5/Bul1/Bul2-Komplex und der Translokation von Gln3 vom Zytoplasma in den Nukleus wird kontrovers diskutiert (Crespo *et al.*, 2004; Feller *et al.*, 2006). Nach Crespo *et al.* (2004) erfolgt eine Regulation der Gln3-Aktivität sowohl direkt durch Npr1 als auch durch den Rsp5/Bul1/Bul2-Komplex. Dabei soll der Effekt der Ubiquitinligase epistatisch zu der Regulation durch Npr1 sein (Abb. 13).

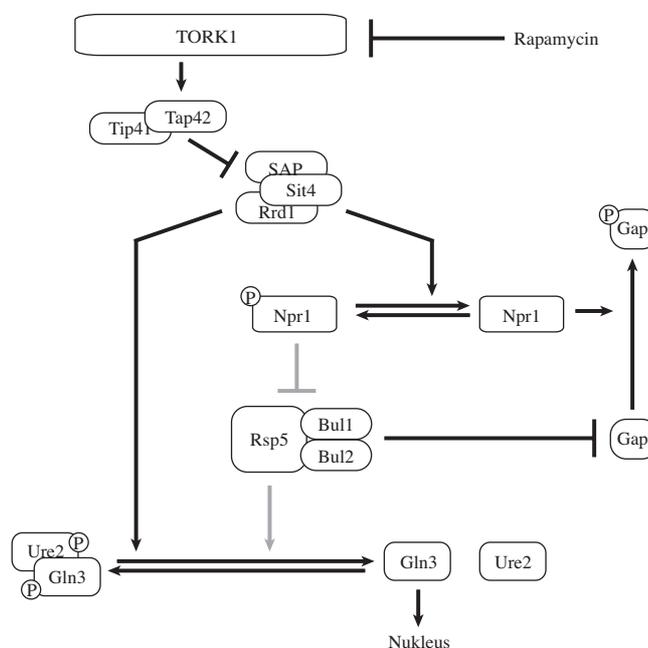


Abb. 13: Die Lokalisation von Gln3 ist abhängig von TORK1.

Der Transkriptionsfaktor Gln3 wird TORK1-abhängig von Sit4 dephosphoryliert, trennt sich von seinem Inhibitor Ure2 und gelangt in den Zellkern. Der Einfluss der Ubiquitinligase Rsp5 auf diesen Vorgang ist umstritten. Die Kinase Npr1 und ein Komplex aus Rsp5, Bul1 und Bul2 kontrollieren TORK1-abhängig die Internalisation von verschiedenen Aminosäuretransportern. Kontrovers diskutierte Einflüsse sind in grau dargestellt (modifiziert nach Tate *et al.*, 2006).

Das gilt jedoch nur, wenn die Gln3-Aktivierung durch einen Wechsel auf die schlechte Stickstoffquelle Prolin erfolgte. Rapamycin führte nicht zu einer Rsp5/Bul1/Bul2-abhängigen Translokation. Feller *et al.* (2006) halten diese Ergebnisse für indirekte Effekte und konnten sie in eigenen Messungen nicht reproduzieren. Weniger spekulativ als die Beteiligung des Rsp5/Bul1/Bul2-Komplexes an dieser Regulation ist der Einfluss von Npr1. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Gln3 in einer *npr1*-Deletionsmutante

auch in Anwesenheit von ausreichend Ammonium, nicht jedoch bei anderen guten Stickstoffquellen im Kern verbleibt (Tate *et al.*, 2006).

1.4.2.4 Die HECT-E3-Ligase Rsp5

Die Ubiquitinligase Rsp5 gehört zu den HECT-Ubiquitinligasen. Diese agieren als Monomer und binden das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 mit ihrer HECT-Domäne sowie das Substrat über WW-Proteinbindedomänen. Im Gegensatz zu den RING-E3-Ubiquitinligasen übernehmen sie das konjugierte Ubiquitin von E2 durch die Ausbildung eines Thioesters mit einem konservierten Cystein innerhalb der HECT-Domäne (Huibregtse *et al.*, 1995; Scheffner *et al.*, 1995). Die am besten untersuchte HECT-E3-Ubiquitinligase ist Rsp5, ein Homolog aus der Familie der Nedd4-HECT-E3-Ligasen (Ingham *et al.*, 2004). Die WW-Domänen, mit denen Rsp5 seine Substrate bindet, sind ca. 40 Aminosäuren umfassende Abschnitte, die ein Prolin-x-Tyrosin-Motiv (P-x-Y) binden (Hoppe *et al.*, 2000; Shcherbik *et al.*, 2004). Durch Bindung dieser Motive werden beispielsweise die Transkriptionsfaktoren Spt23 und Mga2 am endoplasmatischen Retikulum ubiquitiniert, durch das 26S-Proteasom prozessiert und in ihrer nunmehr aktiven Form in den Kern transportiert (Hoppe *et al.*, 2000). Im Nukleus wiederum scheint die Markierung für den endgültigen Abbau von Spt23 erneut von Rsp5 abzuhängen. Wahrscheinlich wird hier Ufd2 als Cofaktor genutzt (Richly *et al.*, 2005), denn für die Bildung einer Ubiquitinkette wird unter Umständen noch ein weiteres konjugierendes Enzym benötigt. In *S. cerevisiae* ermöglicht erst das Protein Ufd2 der HECT-E3-Ligase Ufd4 mehr als zwei Ubiquitinreste an ein Substrat zu binden (Koegl *et al.*, 1999). Diese Art von Hilfsfaktoren wurde E4 genannt. Im Falle von Ufd2 wird die Ligaseaktivität von der strukturell zum RING-Motiv homologen U-Box-Domäne vermittelt (Aravind und Koonin, 2000). Neben Ufd4 ist Rsp5 in *S. cerevisiae* die einzige bekannte E3-Ligase, die Substrate auch kooperativ mit einem E4 ubiquitiniert. Rsp5 kontrolliert unter anderem die Internalisierung der Aminosäure-Permeasen Gap1 mit Hilfe eines Komplexes der Proteine Bul1 und Bul2 ("Bunds to ubiquitin ligase"). Dieser Komplex ist bislang das einzige bekannte Beispiel für E4-Ligaseaktivität ohne U-Box-Domäne. Allein kann Rsp5 die Permease Gap1 nur monoubiquitinieren, Bul1/2 vermitteln hier die Bildung einer Polyubiquitinkette, die ein Signal für Endozytose, Eintritt und Transport in das *trans*-Golgi-Netzwerk und Degradation in der Vakuole darstellt (Helliwell *et al.*, 2001). Die bekannten Funktionen von Rsp5 sind darüber hinaus außerordentlich vielfältig: Es reguliert beispielsweise den α -Faktor-Rezeptor Ste2 (Dunn und Hicke, 2001; Terrell *et al.*, 1998), den Tryptophantransporter Tat2 (Beck *et al.*, 1999 b), den Kerntransport der Stress-induzierten Transkriptionsfaktoren Hsf1 und Msn4 (Haitani *et al.*, 2006) und die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (Chang *et al.*, 2000). Dabei ist Rsp5 konstitutiv aktiv. Als Regulator der Ubiquitinierungsreaktionen scheinen die Proteine Ubp2 und Rup1

permanent an Rsp5 gebunden zu sein. Die Substratbindung wird davon nicht beeinflusst (Kee *et al.*, 2005; Kee *et al.*, 2006). Möglicherweise erleichtert das Wechselspiel aus Ubiquitinierung und Ubiquitin-Proteaseaktivität die Bildung unterschiedlicher Ubiquitinierungsmuster (Kee und Huibregtse, 2007).

1.4.2.5 Generelle Kontrolle der Aminosäurebiosynthese

Ein weiteres von TORK1 beeinflusstes Regulationsnetzwerk ist die allgemeine oder generelle Kontrolle der Aminosäurebiosynthese ("General amino acid control", GAAC). Ihr zentraler Transkriptionsfaktor Gcn4 wird aktiviert, wenn die Zelle ein Ungleichgewicht der Aminosäureversorgung registriert. Aber auch verschiedene Arten von Stress, wie UV-Exposition, hohe Salzkonzentrationen im Medium sowie Mangel an Purinen oder Glukose führen ebenso zur Aktivierung der Gcn4-abhängigen Transkription wie die Blockierung des TORK1 durch Rapamycin (Engelberg *et al.*, 1994; Goossens *et al.*, 2001; Hinnebusch, 1992; Mösch *et al.*, 1991; Niederberger *et al.*, 1981; Valenzuela *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2000). Die Reaktionen auf diese Signale sind vielfältig. Gene für die Aminosäurebiosynthese werden angeschaltet, Transportsysteme stärker exprimiert, die Purinbiosynthese reguliert sowie Synthesevorgänge und Autophagie aufeinander abgestimmt (Natarajan *et al.*, 2001).

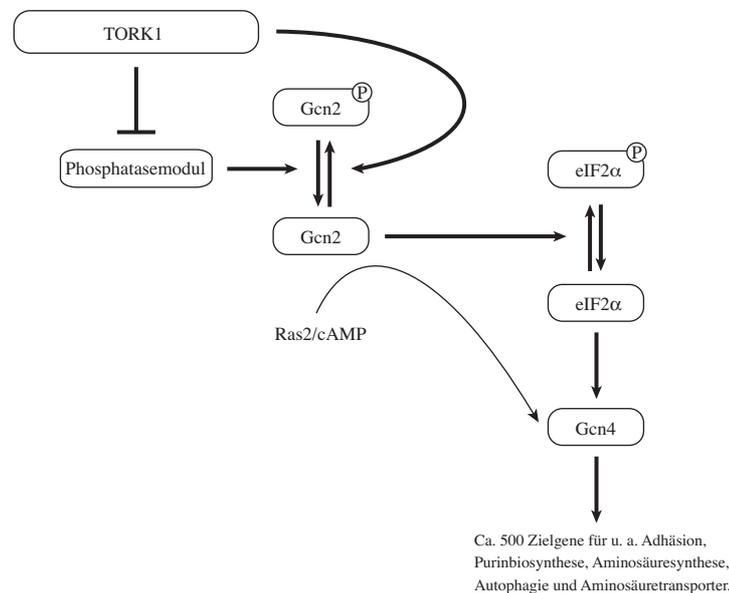


Abb. 14: TORK1 kontrolliert die Sensorkinase Gcn2 der GAAC.

Das System der GAAC kontrolliert durch den Transkriptionsfaktor Gcn4 über 500 Zielgene. Die Sensorkinase Gcn2 wird TORK1-abhängig sowohl phosphoryliert als auch dephosphoryliert. Sie bestimmt die Aktivität des Translationsinitiationsfaktors eIF2α. Im dephosphorylierten Zustand inhibiert er einen GTP/GDP-Austauschfaktor, stört damit die Translationsinitiation und verhilft der durch Attenuation gesteuerten *GCN4*-mRNA zur Translation.

Darüber hinaus stimuliert Gcn4 in einem *FLO11*-abhängigen Mechanismus das adhäsive Wachstum von *S. cerevisiae* (Braus *et al.*, 2003). Die Sensor kinase Gcn2 der GAAC wird von einer bislang nicht bekannten Kinase TORK1-abhängig an ihrem Serin-577 phosphoryliert und damit inhibiert. Die Blockierung des TORK1 durch Rapamycin führt zu einer signifikanten Dephosphorylierung dieser Position. Der Vorgang ist abhängig von Tap42 und Sit4, aber unabhängig von den katalytischen Untereinheiten der PP2A (Pph21, Pph22 und Pph3). Die Rolle der SAPs ist in diesem Zusammenhang noch nicht geklärt (Hinnebusch, 2005). Der Phosphorylierungsstatus von Gcn2 bestimmt die Bindefähigkeit der Sensor kinase für unbeladene tRNAs, ihrem eigentlichen Aktivierungssignal. Ist Gcn2 aktiviert, phosphoryliert es die α -Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2, was seinen GTP/GDP-Ausstauschfaktor eIF2B blockiert. Als Folge ist die Translationsinitiation gestört und die durch Attenuation gesteuerte mRNA von *GCN4* wird translatiert. TORK1 aktiviert also Gcn4 und das System der generellen Kontrolle, inhibiert jedoch eIF2-abhängig die Translationsinitiation (Cherkasova und Hinnebusch, 2003; Kubota *et al.*, 2003). Die im Modell (Abb. 14) zusätzlich gezeigte Aktivierung von Gcn4 durch den Ras2/cAMP-Signalweg ist Gcn2-abhängig, aber nicht TORK1-reguliert. Sie ist von *S. cerevisiae* bis zu den Säugetieren konserviert und erfolgt bei Glukosemangel und UV-Exposition (Marbach *et al.*, 2001).

1.5. Ziele dieser Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit lag im Aufdecken möglicher Regulationsmechanismen, die unter verschiedenen Umweltbedingungen auf den Transkriptionsfaktor Tec1 und damit auf seine Zielgene wirken. Zu Beginn dieser Arbeit war nur bekannt, dass die Transkription des *TEC1*-Gens durch den Transkriptionsfaktor Ste12 und den darüber stehenden Pheromon-induzierten MAPK-Signaltransduktionsweg reguliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Tec1 auch auf posttranslationaler Ebene einer Regulation durch diesen Pheromon-induzierten MAPK-Signalweg unterliegt. Da Tec1 außerdem eine generelle Funktion bei den Nährstoff-kontrollierten Prozessen des adhäsiven und filamentösen Wachstums einnimmt, sollte zudem untersucht werden, inwieweit Tec1 durch bestimmte Nährstoffe oder Nährstoff-gesteuerte Signalwege reguliert wird.

2. ERGEBNISSE

2.1. Regulation von Tec1 durch den Pheromon-induzierten MAPK-Signalweg

Der Signaltransduktionsweg des adhäsiven Wachstums und der Konjugation nutzt für die Verarbeitung unterschiedlicher Signale teilweise identische Komponenten. Der Transkriptionsfaktor Ste12 ist beispielsweise ein direktes Regulationsziel von Fus3 und Kss1 und wird für die Ausführung beider Programme benötigt (Bardwell *et al.*, 1998; Elion *et al.*, 1993; Madhani *et al.*, 1997). Hier sollte genauer untersucht werden, ob die Aktivierung des adhäsiven Wachstums oder der Konjugation auch die Regulation des Transkriptionsfaktors Tec1 beinhaltet und auf welcher Ebene die Signalspezifität erreicht wird.

2.1.1. Tec1 interagiert mit Fus3 und Kss1 über unterschiedliche Domänen

In einer früheren Studie wurde eine Assoziation von Tec1 mit Kss1, nicht jedoch mit Fus3 demonstriert (Ho *et al.*, 2002). Um eine mögliche physikalische Interaktion beider MAPK mit Tec1 näher zu untersuchen, wurden Co-Affinitätsreinigungen durchgeführt. Fus3 und Kss1 wurden dafür als GST-Fusionsproteine zusammen mit Epitop-markiertem Tec1 in *S. cerevisiae* exprimiert. Die GST-Fusionsproteine wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt und im Immunoblot auf ihre Assoziation mit Tec1 überprüft (Abb. 15). Dabei konnte gezeigt werden, dass Tec1 sowohl mit Fus3 als auch mit Kss1 zusammen aufgereinigt wird. Das GST-Epitop allein war hierfür nicht ausreichend. Das bedeutet, dass Tec1 nicht nur, wie bereits beschrieben, mit Kss1, sondern auch mit Fus3 eine Interaktion eingeht. Kss1 wurde ursprünglich in einem Komplex mit Tec1 gefunden, der auch Ste12 enthielt (Ho *et al.*, 2002). Dieser Transkriptionsfaktor wurde bereits zuvor als Interaktionspartner von Tec1 beschrieben (Madhani und Fink, 1997). Um zu überprüfen, ob die gezeigten Interaktionen der MAPK mit Tec1 eventuell von Ste12 als Bindeglied abhängen, wurden die Co-Affinitätsexperimente unter Verwendung einer *ste12*-Deletionsmutante wiederholt. Dabei stellte sich heraus, dass nur noch die Interaktion von Fus3 und Tec1 nachweisbar war. Die Interaktion von Kss1 mit Tec1 scheint demnach von der Gegenwart des Transkriptionsfaktors Ste12 abhängig zu sein. Möglicherweise erfolgt die Komplexbildung von Tec1 mit den MAPK Fus3 und Kss1 über unterschiedliche Domänen des Transkriptionsfaktors. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden weitere Co-Affinitätsexperimente mit den MAPK und unterschiedlichen Tec1-Varianten durchgeführt. Dabei wurden die Bindestudien einmal mit der N-terminalen Hälfte (Tec1^{M1-E280}) und einmal mit der C-terminalen Hälfte von Tec1 (Tec1^{K281-Y486}) wiederholt. Es stellte sich heraus, dass Tec1^{M1-E280} ausreichte, um Fus3, jedoch nicht Kss1 zu binden, und dass umgekehrt Tec1^{K281-Y486} eine Interaktion mit Kss1, aber nicht mit Fus3 einging.

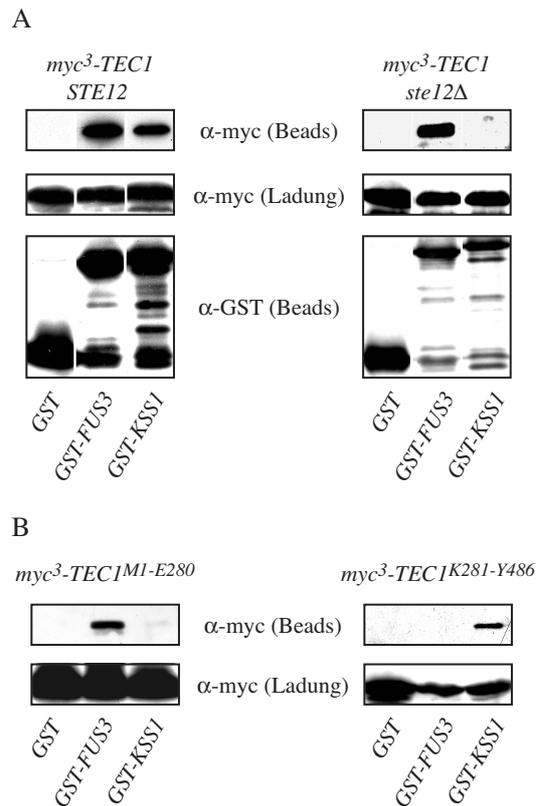


Abb. 15: Tec1 interagiert mit Fus3 und Kss1 über unterschiedliche Domänen.

A) Abgebildet sind Co-Affinitätsreinigungen von Tec1 mit Fus3 und Kss1. In den Stämmen YHUM0610 (*tec1Δ*, *STE12*) und YHUM0619 (*tec1Δ*, *ste12Δ*) wurden das Plasmid BHUM0768 (*myc³-TEC1*) zusammen mit entweder pYGEX-2T (*GST*), BHUM0756 (*GST-FUS3*) oder BHUM0755 (*GST-KSS1*) exprimiert. Es wurden Proteinrohextrakte hergestellt, einer GST-Affinitätsreinigung unterzogen und im Immunoblot untersucht. Dazu wurde ein polyklonaler anti-GST- (α -GST) und ein monoklonaler anti-myc-Antikörper (α -myc) verwendet. Tec1-Protein, welches nach Assoziation mit Fus3 oder Kss1 co-aufgereinigt wurde, ist im obersten Feld zu sehen (Beads). Darunter sieht man das geladene Tec1-Protein vor der Affinitätsreinigung (Ladung). Das unterste Feld zeigt die gereinigten GST-Fusionsproteine (Beads). B) Analog zu A) wurden Co-Affinitätsreinigung der N-terminalen Hälfte von Tec1 mit Fus3 und der C-terminalen Hälfte von Tec1 mit Kss1 durchgeführt. Der Stamm YHUM0610 (*tec1Δ*) trug das Plasmid BHUM0760 (*myc³-TEC1^{MI-E280}*) oder BHUM0769 (*myc³-TEC1^{K281-Y486}*) sowie eines der GST-Fusionskonstrukte pYGEX-2T (*GST*), BHUM0756 (*GST-FUS3*) oder BHUM0755 (*GST-KSS1*).

Es lässt sich also festhalten, dass unterschiedliche Domänen des Transkriptionsfaktors Tec1 für die Interaktion mit den MAPK Fus3 und Kss1 verantwortlich sind. Die N-terminale Hälfte mit den Aminosäuren 1-280 vermittelt dabei die Interaktion mit Fus3 und die C-terminale Hälfte mit den Aminosäuren 281-486 die mit Kss1.

2.1.2. Fus3, aber nicht Kss1 phosphoryliert Tec1 *in vitro*

Da eine Interaktion von Tec1 mit den MAPK nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage nach einer möglichen Phosphorylierung von Tec1 durch Fus3 und Kss1. Hierfür wurden *in vitro*-Kinase-Experimente mit gereinigten Proteinen durchgeführt. Tec1 wurde als Fusionsprotein mit einem N-terminalen MBP- und einem C-terminalen FLAG-Epitop heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt (Madhani und Fink, 1997). Fus3 und Kss1 wurden als GST-Fusionsproteine aus Hefezellen gereinigt, und zwar bevor und nachdem diese mit Pheromon behandelt wurden. Als Kontrolle für die Kinaseaktivität wurden zwei katalytisch inaktive Varianten der MAPK, Fus3^{K42D} und Kss1^{K42R} (Gartner *et al.*, 1992), ebenfalls vor und nach einer Pheromonbehandlung als GST-Fusionsproteine gereinigt. Die Phosphorylierung von MBP-Tec1 durch Fus3 oder Kss1 wurde über die Verwendung von radioaktivem γ -³²P-ATP nachweisbar (Abb. 16).

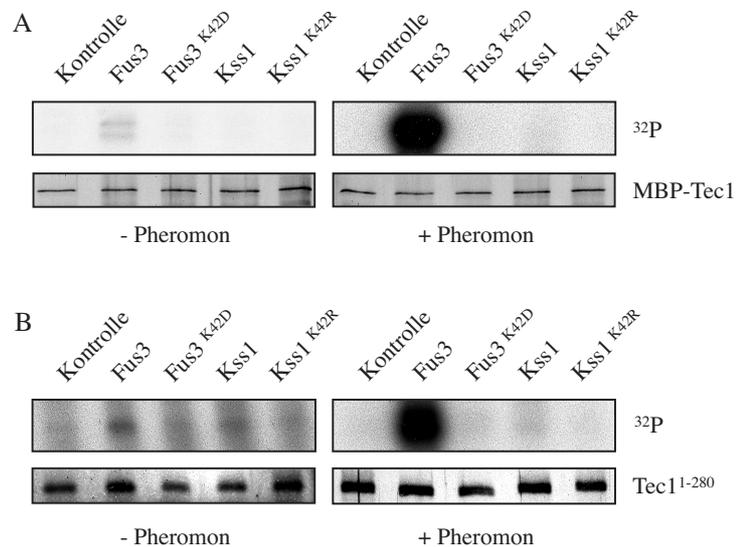


Abb. 16: Fus3, aber nicht Kss1 phosphoryliert Tec1 *in vitro*.

A) Fus3 (BHUM0756), Fus3^{K42D} (BHUM0766), Kss1 (BHUM0755) oder Kss1^{K42R} (BHUM0767) wurden in YHUM0610 (*tec1Δ*) mit (+ Pheromon) oder ohne Zugabe von 0,5 μM α-Faktor (- Pheromon) exprimiert, gereinigt und mit 200 ng MBP-Tec1 und γ -³²P-ATP inkubiert. GST (pYGEX-2T) diente als Kontrolle. Die Reaktionsansätze wurden einer PAGE unterzogen und die Bindung des ³²P an Tec1 durch Autoradiographie (³²P), bzw. die gleichmäßige Beladung durch eine Protein-Silberfärbung (MBP-Tec1) abgebildet. B) Abgebildet ist die Phosphorylierung der N-terminalen Hälfte von Tec1 durch Fus3. Die GST-Fusionsproteine wurden wie oben beschrieben gewonnen, aber hier mit gereinigtem Tec1¹⁻²⁸⁰ aus einer heterologen Expression in *E. coli* inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte analog der Beschreibung in A).

Vor der Aktivierung der MAPK durch α-Faktor wurde Tec1 von Fus3 nur schwach und von Kss1 überhaupt nicht phosphoryliert. Nach der Aktivierung der Kinasen durch Pheromon wurde jedoch eine sehr starke Phosphorylierung von Tec1 durch Fus3 sichtbar.

Weder Kss1 noch eine der katalytisch inaktiven MAPK-Varianten waren dagegen in der Lage, signifikante Mengen ^{32}P an MBP-Tec1 zu binden. Dies bedeutet, dass als Reaktion auf Pheromon Fus3, aber nicht Kss1 in der Lage ist, Tec1 zu phosphorylieren. Da Fus3 mit der N-terminalen Hälfte von Tec1 interagiert, wurde überprüft, ob die Aminosäuren 1-280 von Tec1 ausreichend für eine Phosphorylierung durch die MAPK sind. Tec1^{M1-E280} wurde dafür als GST-Fusion heterolog in *E. coli* exprimiert und das Epitop proteolytisch vom Rest des Proteins abgetrennt. In den folgenden Experimenten wurde Tec1^{M1-E280} von Pheromon-stimuliertem Fus3 stark phosphoryliert, während Kss1 sowie Fus3^{K42D} und Kss1^{K42R} dazu erneut nicht in der Lage waren. Die N-terminale Hälfte von Tec1 ist also ausreichend, um von Fus3 aber nicht von Kss1 als Reaktion auf Pheromon phosphoryliert zu werden.

2.1.3. Tec1 wird unter Pheromoneinfluss posttranslationell von Fus3 reguliert

Um die Regulation von Tec1 durch Fus3 und Kss1 *in vivo* zu untersuchen, wurde die Transkriptmenge von *TEC1* mit der Proteinmenge verglichen. Die Messungen erfolgten dabei abhängig von der Stimulation der Zellen durch Pheromon und der Gegenwart der MAPK Fus3 und Kss1 bzw. der MAPKK Ste7.

Wie in vorangegangenen Studien gezeigt, konnte die positive Regulation von *TEC1* durch das MAPK-Modul und Pheromon bestätigt werden. Dieser Befund ist durch die Kontrolle des *TEC1*-Promotors über Ste12-abhängige PRE zu erklären (Köhler *et al.*, 2002; Oehlen und Cross, 1998). Die Menge des Tec1-Proteins korrelierte jedoch nicht mit der ermittelten Transkriptmenge. Die intrazelluläre Tec1-Proteinmenge nahm durch die Applikation von Pheromon stark ab, während die Transkriptmenge anstieg (Abb. 17). Bemerkenswerterweise verringerte sich die Tec1-Proteinmenge unter dem Einfluss von Pheromon nicht, wenn dem Stamm die MAPK Fus3 fehlte. Die Deletion von *KSSI* konnte diese Reduktion nicht verhindern. Fehlten beide MAPK fand erneut keine Regulation der Tec1-Proteinmenge durch Zugabe von Pheromon statt. Diese Resultate lassen vermuten, dass Fus3, aber nicht Kss1 die Pheromon-induzierte Regulation von Tec1 vermittelt. Demnach sollte auch die Deletion von *STE7* ausreichen, um die Regulation von Tec1 durch Pheromon zu inhibieren, da Ste7 die Aktivierung von Fus3 vermittelt. Ohne Ste7 kommt es jedoch, unabhängig von der Pheromonwirkung, zu einer signifikanten Verringerung der *TEC1*-Transkriptmenge. Die Abwesenheit von Ste7 führt nämlich auch zu großen Mengen unphosphoryliertem Kss1, welches in dieser Form den Transkriptionsfaktor Ste12 und damit die Expression von *TEC1* blockiert (Bardwell *et al.*, 1998; Köhler *et al.*, 2002). Um dieses Problem zu umgehen und um die Vermutung der posttranslationalen Regulation von Tec1 durch den Pheromonsignalweg zu bestätigen, wurde *TEC1* vom Promotor des *URA3*-Gens exprimiert. Dieser Promotor weist eine

vergleichbare Stärke wie der von *TEC1* auf, steht jedoch nicht unter Kontrolle der Pheromon-abhängigen Signaltransduktion (Holstege *et al.*, 1998). Tatsächlich reichte die Expression von *TEC1* durch den *URA3*-Promotor aus, um die transkriptionelle Kontrolle des Transkriptionsfaktors von der Regulation des Pheromonsignalweges zu entkoppeln.

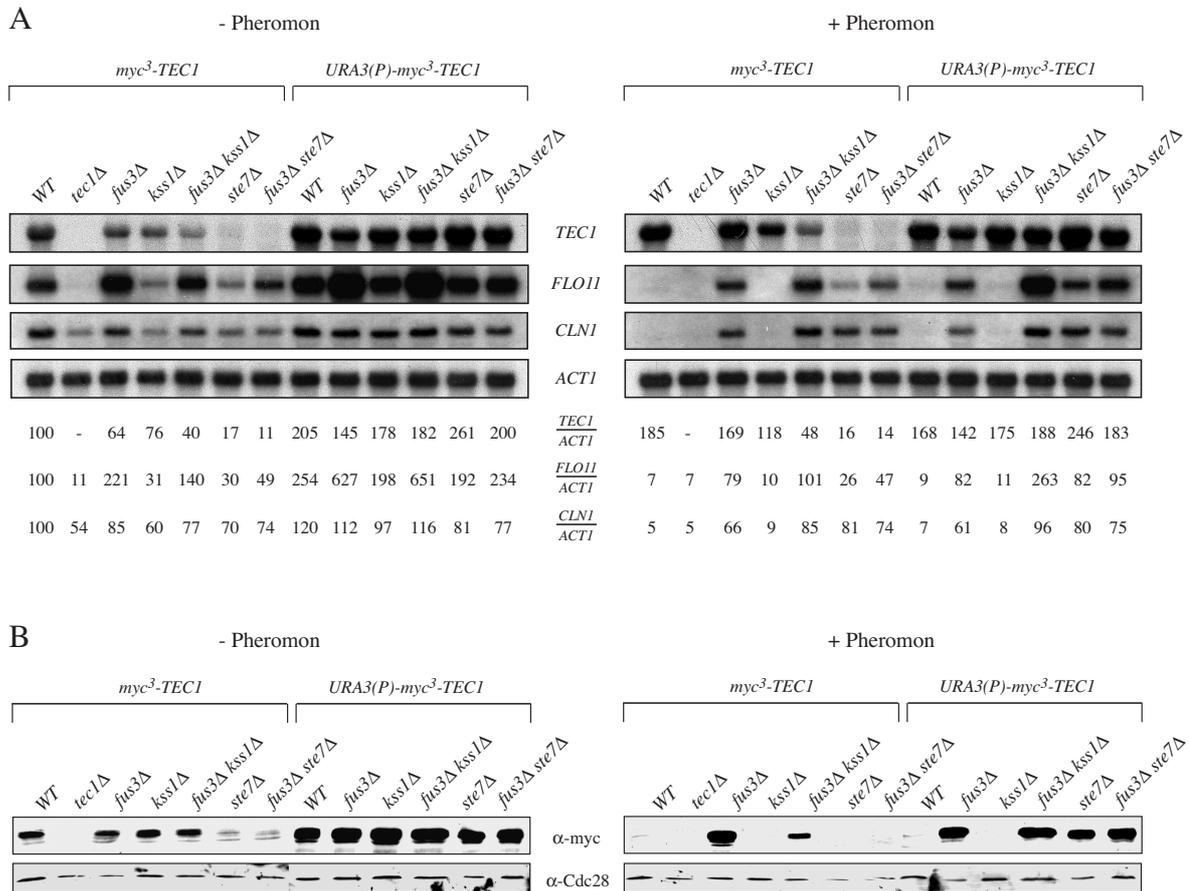


Abb. 17: Regulation von Tec1 und seinen Zielgenen *CLN1* und *FLO11* durch Pheromon und die MAPK Fus3 und Kss1.

A) Transkript-Analyse: Die Gesamt-RNA der unten aufgeführten *S. cerevisiae*-Stämme wurde vor (- Pheromon) und nach einstündiger Inkubation mit 1 μ M α -Faktor (+ Pheromon) isoliert. Die Transkriptmengen von *TEC1*, *FLO11*, *CLN1* und *ACT1* wurden durch eine Northern-Analyse bestimmt und es wurde für die Quantifizierung das Verhältnis zu *ACT1* ermittelt. Als Bezugsgröße diente der *WT*-Stamm ohne Zugabe von Pheromon. Angaben in Prozent (T. Köhler aus Brückner *et al.*, 2004). B) Immunoblot: Aus den bereits in A) verwendeten Stämmen wurden Proteinextrakte hergestellt und Epitop-markiertes Tec1 mit einem monoklonalen anti-myc-Antikörper (α -myc) sowie Cdc28 mit einem polyklonalen anti-Cdc28-Antikörper (α -Cdc28) nachgewiesen. Verwendete Stämme: Chromosomal integriertes *myc³-TEC1* in: YHUM0788 (*WT*), YHUM0610 (*tec1Δ*), YHUM0795 (*fus3Δ*), YHUM0801 (*kss1Δ*), YHUM0807 (*fus3Δ kss1Δ*), YHUM0811 (*ste7Δ*) und YHUM0812 (*fus3Δ ste7Δ*). Chromosomal integriertes *URA3(P)-myc³-TEC1* in: YHUM0813 (*WT*), YHUM0814 (*fus3Δ*), YHUM0815 (*kss1Δ*), YHUM0816 (*fus3Δ kss1Δ*), YHUM0817 (*ste7Δ*) und YHUM0818 (*fus3Δ ste7Δ*) (T. Köhler aus Brückner *et al.*, 2004).

Die *TEC1*-Transkriptmengen aller Stämme wiesen unter der Kontrolle des *URA3*-Promotors unabhängig von der Zugabe von Pheromon vergleichbare hohe Werte auf. Die Menge des Tec1-Proteins war jedoch unter dem Einfluss von Pheromon weiterhin stark vermindert, und zwar abhängig von aktiviertem Fus3. In allen Stämmen, in denen *FUS3* oder *STE7*, das Gen seiner aktivierenden MAPKK, deletiert wurden, blieb die Tec1-Proteinmenge auch nach Zugabe von Pheromon konstant. Dies lässt vermuten, dass Fus3 nach Aktivierung durch den Pheromonsignalweg den Transkriptionsfaktor Tec1 auf posttranslationellem Wege reguliert.

Diese Regulation durch Pheromon und Fus3 spiegelt sich auch in den Transkriptmengen der Tec1-Zielgene *CLN1* und *FLO11* wieder (Köhler *et al.*, 2002; Lo und Dranginis, 1998; Madhani *et al.*, 1999). Hier sieht man eine klare Korrelation zwischen der ermittelten Tec1-Proteinmenge und der Expression beider Gene. Sowohl *CLN1* als auch *FLO11* werden unter dem Einfluss von Pheromon transkriptionell reprimiert. Diese Regulation kann durch die Deletion von *FUS3*, aber nicht durch die Deletion von *KSS1* teilweise aufgehoben werden. Auch hier scheint nur Fus3, aber nicht Kss1 die Pheromon-induzierte Repression der Zielgene von Tec1 zu vermitteln. Dieses Ergebnis steht dann auch im Einklang mit der zuvor gezeigten Fus3-abhängigen Verminderung der Tec1-Proteinmenge nach Zugabe von Pheromon. Die Abwesenheit beider MAPK oder der MAPKK Ste7 entkoppelt die Expression von *CLN1* und *FLO11* vollständig von der Regulation durch Pheromon. Interessanterweise geht die Korrelation zwischen Tec1-Protein und *FLO11*-Transkriptmenge im *ste7*-Deletionshintergrund aber teilweise verloren, was auf einen weiteren Tec1-unabhängigen Mechanismus unter diesen Bedingungen hindeutet.

2.1.4. Ein MAPK-Phosphorylierungsmotiv in Tec1 ermöglicht die Regulation durch Pheromon

Da die Regulation von Tec1 unter Einfluss von Pheromon von der MAPK Fus3 abzuhängen schien, wurde die Aminosäuresequenz des Transkriptionsfaktors nach der minimalen Konsensussequenz Serin/Threonin-Prolin (S/T-P) für die Phosphorylierung durch MAPK durchsucht (Sharrocks *et al.*, 2000). Von den acht dabei gefundenen S/T-P-Motiven liegen drei in der N-terminalen Hälfte von Tec1, die durch Fus3 gebunden und phosphoryliert wird: Serin 86, Threonin 252 und Threonin 273. Um die Funktion dieser Positionen im Hinblick auf die Regulation durch Pheromon weiter zu untersuchen, wurden parallel zwei Strategien vorangetrieben. 1) Es wurden Tec1-Varianten erzeugt, deren Serin oder Threonin an diesen Positionen durch Alanin ersetzt wurde. Damit kamen sie als potentiell Phosphorylierungsziel an der jeweiligen Stelle nicht mehr in Frage. 2) Eine Kollektion hyperaktiver Tec1-Varianten aus einer früheren Arbeit wurde auf einen zufälligen Aminosäureaustausch an einem der drei möglichen Phosphorylierungsmotive

überprüft. Dabei wurden mit den hyperaktiven $Tec1^{T273M}$ und $Tec1^{P274S}$ zwei Mutationen ermittelt, deren Positionen gemeinsam das dritte S/T-P-Motiv in der N-terminalen Hälfte von Tec1 bilden. Um die Funktion dieses potentiellen MAPK-Phosphorylierungsmotivs für die Regulation von Tec1 unter Einfluss von Pheromon zu untersuchen, wurden Transkript- und Proteinprofile von Stämmen erstellt, die entweder $Tec1^{T273M}$ oder $Tec1^{P274S}$ exprimierten (Abb. 18).

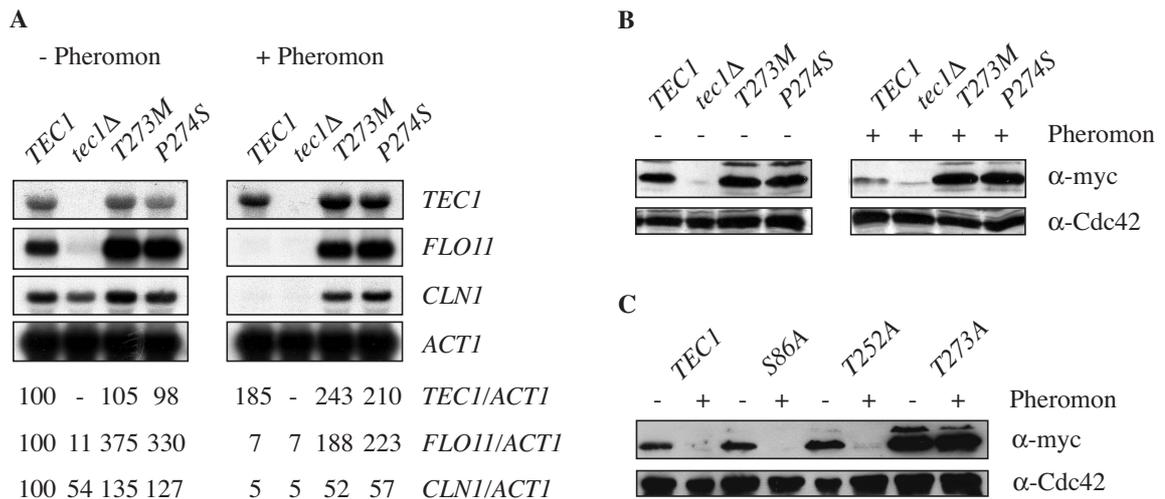


Abb. 18: Funktion des MAPK-Phosphorylierungsmotivs in Tec1.

A) Transkript-Analyse: Die Gesamt-RNA von Stämmen, die *TEC1*, kein *TEC1* (*tec1Δ*), $TEC1^{T273M}$ (T273M) oder $TEC1^{P274S}$ (P274S) exprimierten, wurde vor (- Pheromon) und nach Zugabe von 1 μ M α -Faktor (+ Pheromon) isoliert. Die Transkriptmengen von *TEC1*, *FLO11*, *CLN1* und *ACT1* wurden durch eine Northern-Analyse bestimmt, und es wurde für die Quantifizierung das Verhältnis zu *ACT1* ermittelt. Als Bezugsgröße diente der *TEC1*-Stamm ohne Zugabe von Pheromon. Angaben in Prozent (T. Köhler aus Brückner *et al.*, 2004). B) Immunoblot: Aus den bereits in A) verwendeten Stämmen wurden Proteinextrakte hergestellt und Epitop-markiertes Tec1 mit einem monoklonalen anti-myc-Antikörper (α -myc) sowie Cdc42 mit einem polyklonalen anti-Cdc42-Antikörper (α -Cdc42) nachgewiesen. C) Immunoblot (unter Mitarbeit von B. Heise aus Brückner *et al.*, 2004): In dem Stamm YHUM0792 wurden unterschiedliche Tec1-Varianten exprimiert: BHUM0687 (*TEC1*), BHUM1153 ($TEC1^{S86A}$), BHUM1154 ($TEC1^{T252A}$), BHUM1155 ($TEC1^{T273A}$). Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu B).

Tatsächlich wurde die Tec1-Proteinmenge in diesen Stämmen nicht mehr durch Pheromon reguliert. Beide Proteinvarianten waren so stabil, als sei Fus3 deletiert. Als Konsequenz daraus waren hier auch die Tec1-Zielgene *CLN1* und *FLO11* nicht mehr durch Pheromon reprimierbar. Die Aminosäurepositionen T273 und P274 des Tec1-Proteins bilden also möglicherweise ein funktionales MAPK-Phosphorylierungsmotiv, das zu einer Pheromon-induzierten Regulation durch Fus3 führt. Entsprechend dieser Vermutung ergab auch die Überprüfung von Tec1 nach einem Aminosäureaustausch von Serin 273 durch Alanin ein

stabiles, nicht mehr durch Pheromon regulierbares Tec1-Protein. Der Austausch der Positionen Serin 86 und Threonin 252 durch Alanin blieb dagegen ohne Auswirkung. Tec1^{S86A} und Tec1^{T252A} waren weiterhin empfindlich gegenüber Pheromon. Wie beim Wildtyp-Tec1 erfolgte auch hier eine starke Verringerung der Proteinmenge. Diese Resultate legen den Schluss nahe, dass die Aminosäuren T273 und P274 ein für die Regulation von Tec1 durch Pheromon und Fus3 wichtiges Motiv bilden.

2.1.5. Der Pheromon-induzierte Abbau von Tec1 ist für einen effizienten Zellzyklusarrest notwendig

Die Entdeckung, dass Pheromon und die MAPK Fus3 die Tec1-Proteinmenge und damit auch die Transkription des G1/S-Phasen-Zyklingens *CLN1* regulieren, führte zu der Vermutung, dass diese negative Regulation des Transkriptionsfaktors wichtig für den Ablauf der Konjugation sein könnte. Zudem inhibiert Fus3, aber nicht Kss1 durch Phosphorylierung den Zellzyklusinhibitor Far1, der dann den Cln/Cdc28-Komplex bindet und so einen G1-Zellzyklusarrest als Reaktion auf Pheromon ermöglicht (Elion *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1993). Da Tec1 die Transkription des Zyklins *CLN1* positiv reguliert (Madhani *et al.*, 1999), ergab sich die Vermutung, dass aktives Tec1 möglicherweise die Ausbildung des Pheromon-induzierten Zellzyklusarrest behindert. Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurden Halo-Experimente mit Stämmen durchgeführt, deren Tec1^{T273M} oder Tec1^{P274S} nicht mehr durch Pheromon regulierbar waren (Abb. 19).

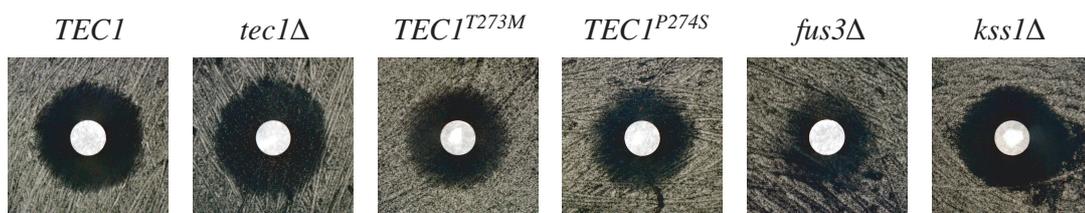


Abb. 19: Pheromon-resistente Tec1-Varianten beeinflussen den Zellzyklus.

Zellsuspensionen der Stämme YHUM0788 (*TEC1*), YHUM0819 (*TEC1^{T273M}*), YHUM0820 (*TEC1^{P274S}*), YHUM0795 (*fus3Δ*), YHUM0801 (*kss1Δ*) wurden auf SC-Leucin plattiert. Ein Rundfilter mit 5 μ l 2 mM α -Faktor-Lösung in Methanol wurde auf der Agaroberfläche platziert. Die gebildeten Hemmhöfe (Halos) wurden nach zwei Tagen Inkubation bei 30°C photographiert.

Tatsächlich führten diese Tec1-Varianten nicht nur zu einer hohen *CLN1*-Transkriptmenge unter Pheromon, sondern auch zu einer signifikanten Verringerung des Hemmhof-Durchmessers, ähnlich der einer *fus3*-Deletionsmutante. Demnach ist die Verringerung der Tec1-Proteinmenge als Reaktion auf die Präsenz von Pheromon ein wichtiger Schritt, um einen effizienten Zellzyklusarrest zu ermöglichen.

2.1.6. Die Regulation der Substratadhäsion durch Kss1 und Fus3 wird über Tec1 vermittelt

Eine Reihe von genetischen und biochemischen Studien haben gezeigt, dass inaktives / nicht-phosphoryliertes Kss1 adhäsives Wachstum durch Bindung und Inhibierung des Transkriptionsfaktors Ste12 verhindert und dass diese Inhibierung durch Ste7-abhängige Phosphorylierung von Kss1 aufgehoben wird (Cook *et al.*, 1997; Madhani *et al.*, 1997). Fus3 soll das adhäsive Wachstum, ähnlich wie Kss1, ebenfalls durch Bindung und Hemmung von Ste12 inhibieren (Bardwell *et al.*, 1998). Zusätzlich steht Fus3 im Verdacht, die Ste7-abhängige Phosphorylierung von Kss1 zu stören (Sabbagh *et al.*, 2001). Der Befund, dass Tec1 in unterschiedlicher Art und Weise mit Fus3 und Kss1 interagiert, führte zu einer näheren Untersuchung dieser Einflüsse während des adhäsiven Wachstums. Dazu wurde die Stärke des adhäsiven Wachstums in Abhängigkeit von Pheromon-regulierbaren oder nicht regulierbaren Tec1-Varianten und den MAPK Fus3 und Kss1 ermittelt (Abb. 20 A, B und C).

Zusammen mit den Ergebnissen der *TECI*- und *FLO11*-Transkript- und Proteinanalysen ergaben sich dabei neue Hinweise auf die Art der Regulation des adhäsiven Wachstums:

- 1) Die Regulation des adhäsiven Wachstums durch beide MAPK, Fus3 und Kss1, ist abhängig von Tec1. Ohne Tec1 konnte, unabhängig von der Präsenz von Fus3 und / oder Kss1, kein adhäsives Wachstum beobachtet werden.
- 2) Die Kontrolle des adhäsiven Wachstums durch Kss1 erfolgt größtenteils durch die Regulation der Transkription von *TECI*. Als Indiz hierfür lassen sich alle Stämme anführen, die nicht-phosphoryliertes Kss1 produzieren, also alle Stämme mit einer *ste7*-Deletion. Hier zeigten sich nur sehr geringe Transkriptmengen, solange *TECI* von seinem eigenen Promotor exprimiert wurde, und die Stämme waren unfähig adhäsiv zu wachsen. Diese Hemmung wurde aufgehoben, sobald Kss1 fehlte, Ste7 normal gebildet wurde oder *TECI* vom heterologen *URA3*-Promotor exprimiert wurde.
- 3) Fus3 reguliert das adhäsive Wachstum durch Manipulation von Tec1 auf Proteinebene. Diese Feststellung beruht auf der Beobachtung, dass Stämme, die ausschließlich Tec1^{T273M} oder Tec1^{P274S} bilden konnten, ähnlich wie eine *fus3*-Deletionsmutante hyperadhäsiv waren. Sie konnten sogar die Repression des adhäsiven Wachstums in Stämmen, die nur noch die MAPK Fus3 bildeten (*kss1Δ*), wieder aufheben.

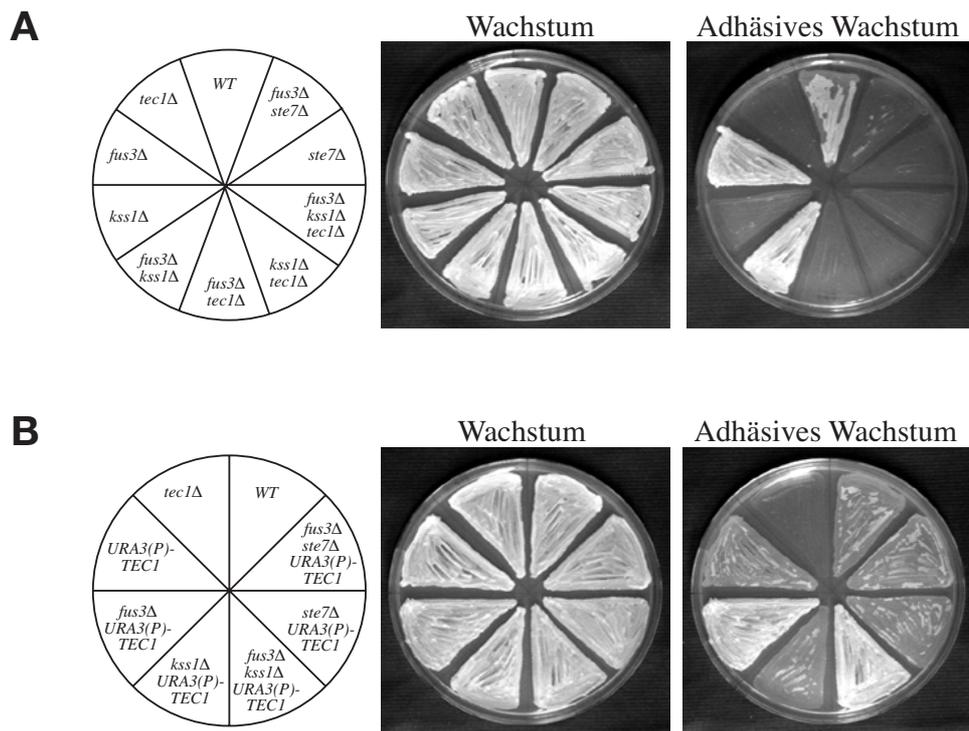


Abb. 20 A und B: Regulation des adhäsiven Wachstums durch Fus3, Kss1 und Tec1.

Die Stämme wurden für 3 Tage auf YEPD inkubiert und die Platten vor (Wachstum) und nach (Adhäsives Wachstum) einer Waschprozedur photographiert. A) Die durch *FUS3* und *KSS1* vermittelte Kontrolle des adhäsiven Wachstums ist abhängig von *TEC1*. Alle Stämme, mit Ausnahme von *tec1Δ*, trugen eine einzelne chromosomal integrierte Kopie von *TEC1* unter Kontrolle des eigenen Promotors. Verwendete Stämme: Chromosomal integriertes *myc³-TEC1* in: YHUM0788 (*WT*), YHUM0812 (*fus3Δ ste7Δ*), YHUM0811 (*ste7Δ*), YHUM0806 (*fus3Δ kss1Δ tec1Δ*), YHUM0800 (*kss1Δ tec1Δ*), YHUM0794 (*fus3Δ tec1Δ*), YHUM0807 (*fus3Δ kss1Δ*), YHUM0801 (*kss1Δ*), YHUM0795 (*fus3Δ*), YHUM0610 (*tec1Δ*). B) Die Ste12-unabhängige Expression von *TEC1* entkoppelt das adhäsive Wachstum von der negativen Regulation durch inaktives Kss1. Alle Stämme, mit Ausnahme des *WT* und *tec1Δ*, trugen eine einzelne chromosomal integrierte Kopie von *TEC1* unter Kontrolle des *URA3*-Promotors (*URA3(P)-TEC1*). Verwendete Stämme: Chromosomal integriertes *URA3(P)-myc³-TEC1* in: YHUM0788 (*WT*), YHUM0818 (*fus3Δ ste7Δ*), YHUM0817 (*ste7Δ*), YHUM0816 (*fus3Δ kss1Δ*), YHUM0815 (*kss1Δ*), YHUM0814 (*fus3Δ*), YHUM0813 (*URA3(P)-TEC1*), YHUM0610 (*tec1Δ*).

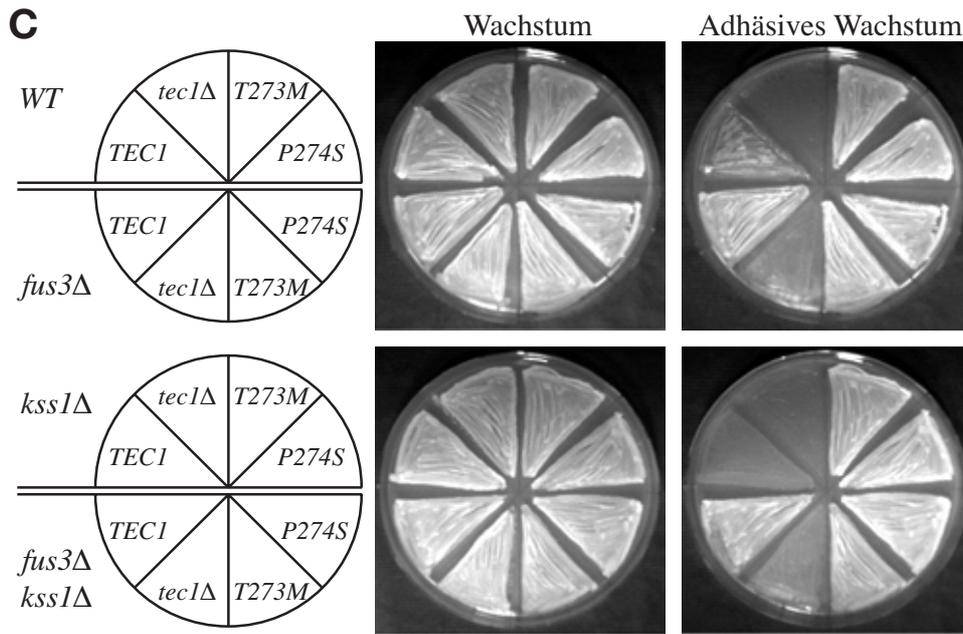


Abb. 20 C: Regulation des adhäsiven Wachstums durch Fus3, Kss1 und Tec1.

Die Stämme wurden für 3 Tage auf YEPD inkubiert und die Platten vor (Wachstum) und nach (Adhäsives Wachstum) einer Waschprozedur photographiert. C) Ein konserviertes MAPK-Phosphorylierungsmotiv in Tec1 ist für die Kontrolle durch Fus3 verantwortlich. Verwendete Stämme: WT: YHUM0788 (*TEC1*), YHUM0610 (*tec1Δ*), YHUM0819 (*T273M*), YHUM0820 (*P274S*). *fus3Δ*: YHUM0795 (*TEC1*), YHUM0794 (*tec1Δ*), YHUM0797 (*T273M*), YHUM0798 (*P274S*). *kss1Δ*: YHUM0801 (*TEC1*), YHUM0800 (*tec1Δ*), YHUM0803 (*T273M*), YHUM0804 (*P274S*). *fus3Δ kss1Δ*: YHUM0807 (*TEC1*), YHUM0806 (*tec1Δ*), YHUM0809 (*T273M*), YHUM0810 (*P274S*).

Damit lässt sich festhalten, dass Kss1 das adhäsive Wachstum durch negative Kontrolle von *TEC1* auf transkriptioneller Ebene kontrolliert und Fus3 den Transkriptionsfaktor durch posttranslationelle Modifikation reguliert. Ein wichtiger Unterschied dabei ist, dass Kss1 in seinem nicht-phosphorylierten Zustand die *TEC1*-Transkription hemmt, während Fus3 erst nach seiner Aktivierung das Tec1-Protein durch Phosphorylierung destabilisiert.

2.2. Regulation von Tec1 durch Nährstoffe und den TOR-Signalweg

Tec1 ist unter anderem für Nährstoff-gesteuerte Prozesse wie Adhäsion und Filamentbildung von Bedeutung. Seine Transkription unterliegt dabei der Regulation durch Nährstoffe und verschiedene Stressbedingungen (Gasch *et al.*, 2000). Da für die Funktion von Tec1 jedoch seine Proteinmenge der ausschlaggebende Faktor ist und da beispielsweise im Falle des Signals "Pheromon" die *TEC1*-Transkription diametral zur Tec1-Proteinmenge reguliert wird, wurde hier die Tec1-Proteinmenge in Abhängigkeit von der Nährstoffversorgung betrachtet. In einem nächsten Schritt sollte dann ermittelt werden, inwieweit bekannte Nährstoff-regulierte Signalwege von *S. cerevisiae*, wie der Ras2 / cAMP-Signalweg, die generelle Kontrolle der Aminosäurebiosynthese oder verschiedene MAPK-Module einen Einfluss auf das Tec1-Protein haben.

2.2.1. Tec1 wird durch Nährstoffe reguliert

Die Tec1-Proteinmenge wurde unter Stickstoff-, Tryptophan-, Leucin- und Uracilmangelbedingungen gemessen bzw. nach Zugabe von Rapamycin oder Koffein. Bei Rapamycin handelt es sich um ein Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus*, das den TOR-Komplex 1 der Bäckerhefe inhibiert. Koffein ist ein Purin-Alkaloid aus Pflanzen, dessen pleiotrope Effekte bislang nur teilweise untersucht wurden. Eine mögliche Wirkung besteht in der Erhöhung des cAMP-Spiegels der Zelle durch die Blockierung der cAMP-Phosphodiesterase (Butcher und Potter, 1972; Tsuzuki und Newburgh, 1975). Neuere Untersuchungen deuten zudem auf eine negative Beeinflussung des TOR-Systems hin (Kuranda *et al.*, 2006).

Um das Tec1-Protein nachweisen zu können, wurde eine myc³-Epitop-markierte Version des Transkriptionsfaktors unter den genannten Bedingungen exprimiert. Für die Untersuchung von Stickstoffmangelbedingungen wurde der Stamm YHUM0456 (*MATa, ura3Δ0*) mit dem Plasmid BHUM0688 (*TEC1(P)-myc³-TEC1, 2μm, URA3*) verwendet. YHUM0610 (*MATa, tec1Δ::HIS3, leu2::hisG, his3::hisG, ura3-52, trp1::hisG*) mit dem Plasmid BHUM0768 (*TEC1(P)-myc³-TEC1, 2μm, LEU2*) wurde bei Tryptophanmangel untersucht, der Stamm YHUM1048 (*MATa, tec1Δ::HIS3, leu2::hisG, his3::hisG, ura3-52, trp1::hisG, TRP1*) mit dem Plasmid BHUM0688 (*TEC1(P)-myc³-TEC1, 2μm, URA3*) wurde für die Untersuchung von Leucinmangel und mit dem Plasmid BHUM0768 (*TEC1(P)-myc³-TEC1, 2μm, LEU2*) für die Untersuchung von Uracilmangel verwendet. Der Einfluss von Rapamycin und Koffein wurde unter Verwendung des Stamms YHUM0610 (*MATa, tec1Δ::HIS3, leu2::hisG, his3::hisG, ura3-52, trp1::hisG*) mit dem Plasmid BHUM0688 (*TEC1(P)-myc³-TEC1, 2μm, URA3*) bestimmt. Die Hefestämme wurden im Selektivmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Danach erfolgte eine

dreistündige Inkubation in YNB unter der jeweiligen Mangelbedingung bzw. unter Zugabe von Rapamycin (200 ng/ml) oder Koffein (10 mM). Der anschließende Immunoblot zeigt, dass die Proteinmenge von Tec1 unter Mangelbedingungen stark zurückgeht (Abb. 21).

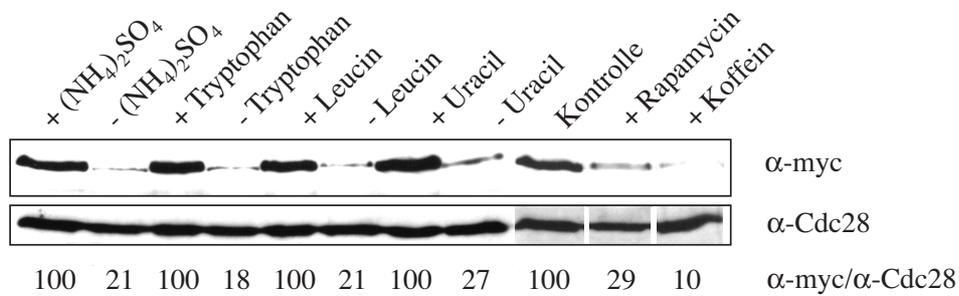


Abb. 21: Nährstoffmangel führt zu einer Abnahme von Tec1.

Stämme von *S. cerevisiae*, die myc³-Tec1 exprimierten, wurden 3 Stunden in YNB unter den gekennzeichneten Mangelbedingungen inkubiert und die hergestellten Proteinextrakte im Immunoblot untersucht. Rapamycin wurde in einer Endkonzentration von 200 ng/ml, Koffein von 10 mM eingesetzt. Tec1 wurde durch einen Antikörper gegen sein myc³-Epitop detektiert (α-myc). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28, die katalytische Untereinheit der Zyklin-abhängigen Protein-Kinase (α-Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von α-myc zu α-Cdc28 ermittelt (α-myc/α-Cdc28). Angaben in Prozent. Verwendete Stämme: YHUM0456 <BHUM0688> ((NH₄)₂SO₄), YHUM0610 <BHUM0768> (Tryptophan), YHUM1048 <BHUM0688> (Leucin), YHUM1048 <BHUM0768> (Uracil) und YHUM0610 <BHUM0688> (Rapamycin, Koffein).

Unter Stickstoff-, Tryptophan-, Leucin- oder Uracilmangel konnten nach 3 Stunden nur noch etwa 20% der ursprünglichen Tec1-Menge nachgewiesen werden. Unter dem Einfluss von Rapamycin und Koffein nahm die Tec1-Proteinmenge ebenfalls deutlich ab und sank auf 29% bzw. 10% der Ausgangsmenge.

2.2.2. Ein neuer Antikörper gegen Tec1 bestätigt die negative Regulation durch Rapamycin

Ein mögliches Problem für weitere Untersuchungen war die Verwendung eines Epitop-markierten Tec1-Proteins, da Fusionsproteine in ihrer Stabilität und / oder Regulierbarkeit evtl. abweichende Eigenschaften aufweisen können. Für Tec1 ist z. B. bekannt, dass die N-terminale Fusion mit mehr als drei myc-Epitopen seine Funktion partiell einschränkt. Um Tec1 in endogenen Mengen unter physiologischen Bedingungen nachweisen zu können, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor hergestellt. Da die Expression von *TEC1* auch in *E. coli* sehr schwach ist, wurde hier nur die N-terminale

Hälfte des Gens (*TEC1-NT*), die deutlich stärker exprimiert wurde, mit einem GST-HIS-Tag versehen. Das Fusionsprotein wurde über GSH-Sepharose gereinigt und der Tag mit TEV-Protease abgetrennt. Über eine IMAC-Nickelsäule konnten dann Tec1-NT und der GST-HIS-Tag separiert werden. Durch eine anschließende Gelfiltration und Fraktionierung wurde der Proteinextrakt weiter gereinigt und aufkonzentriert. Das gereinigte Protein wurde für ein Standard-Immunisierungsprotokoll mit zwei Kaninchen verwendet (PINEDA-ANTIKÖRPERSERVICE). Nach vier Monaten wurde das Serum gewonnen und weiter aufgereinigt. Hierfür wurde das Ausgangsprotein auf Nitrocellulosemembran gebロットet und als Affinitätsträger verwendet. Gebundene Antikörper wurden von diesem Träger eluiert und zusätzlich mit einem *tec1Δ*-Proteinextrakt geblockt. Die Antikörper beider Tiere wurden gemischt und die optimale Einsatzmenge der Antikörperlösung empirisch ermittelt (für das genaue Herstellungsverfahren siehe "Material und Methode"). Um die Spezifität des neuen Antikörpers und die Regulation von Tec1 unter Einfluss von Rapamycin zu bestätigen, wurde erneut ein Immunoblot durchgeführt. Der Wildtypstamm YHUM0271 und der *tec1Δ*-Deletionsstamm YHUM0610 wurden bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 jeweils mit einer Rapamycinlösung (Endkonzentration: 200 ng/ml) oder mit der gleichen Menge des verwendeten Lösungsmittels behandelt. Nach 75 Minuten Inkubation wurden die Proteinextrakte gewonnen und dem Immunoblot unterzogen (Abb. 22).

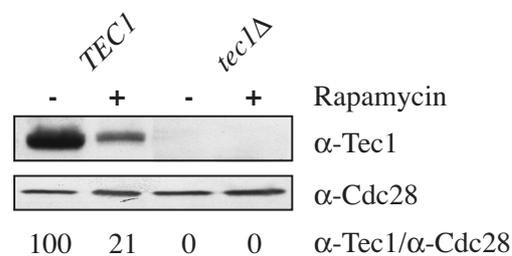


Abb. 22: Der neue Antikörper gegen Tec1 ist spezifisch.

Immunoblot zum Spezifitätsnachweis des neuen Tec1-Antikörpers: Die Stämme YHUM0610 (*tec1Δ*) und YHUM0271 (*TEC1*) wurden 75 Minuten mit 200 ng/ml Rapamycin (+) oder seinem Lösungsmittel (-) inkubiert und die hergestellten Proteinextrakte im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde mit dem neuen polyklonalen Antikörper gegen die N-terminale Hälfte des Tec1-Proteins nachgewiesen (α-Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α-Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. (α-Tec1/α-Cdc28). Angaben in Prozent.

Dabei zeigte sich, dass der neue Antikörper hochspezifisch die endogenen Mengen des Transkriptionsfaktors nachweisen konnte. Die Analyse der *tec1Δ*-Proteinextrakte ergab kein Signal im Immunoblot, während in den Extrakten eines Tec1-Kontrollstammes eine starke Bande auf der erwarteten Laufhöhe des Transkriptionsfaktors zu erkennen ist.

Darüber hinaus konnte der negative Einfluss des Rapamycins auf die Tec1-Proteinmenge mit dem neuen Antikörper bestätigt werden. Nach 75-minütiger Inkubation mit Rapamycin war die Proteinmenge von Tec1 signifikant gesunken. Die Quantifizierung ergab nur noch 21% der Ausgangsmenge.

Als nächstes wurde der zeitliche Verlauf der Rapamycin-induzierten Abnahme von Tec1 bestimmt. Ein Wildtypstamm wurde im Vollmedium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 angezogen, aufgeteilt und mit 200 ng/ml Rapamycin oder dem Lösungsmittel des Rapamycins versetzt. Danach wurden alle 25 Minuten Proben gezogen und für einen Immunoblot aufbereitet (Abb. 23). Die Quantifizierung der Tec1-Menge ergibt eine kontinuierliche Verringerung des Proteins. Visuell ist nach 50 Minuten ein deutlicher Unterschied zur Kontrolle erkennbar. Nach 100 Minuten ist nur noch ungefähr ein Fünftel der Tec1-Ausgangsmenge übrig. Dieses Experiment, hier in *S. cerevisiae* Σ1278b demonstriert, wurde in den verschiedenen genetischen Stammhintergründen W303, S288c und BY4741 wiederholt. In allen gängigen Laborstämmen konnte der Verlust von Tec1 nach Einwirkung von Rapamycin bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

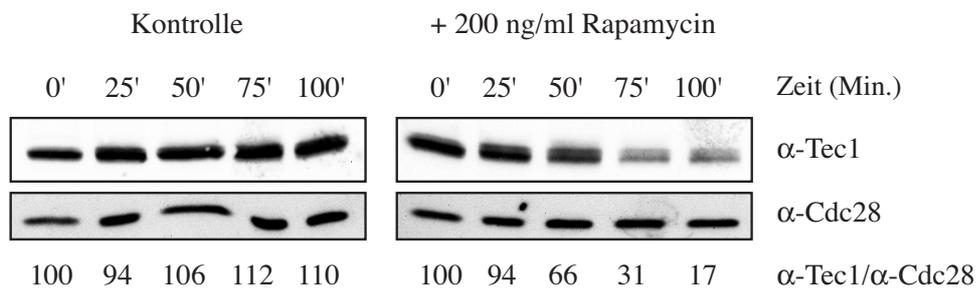


Abb. 23: Im Verlauf der Rapamycinbehandlung nimmt die Tec1-Proteinmenge ab.

Der Wildtypstamm YHUM0271 wurde ohne (Kontrolle) und mit 200 ng/ml Rapamycin inkubiert. Alle 25 Minuten wurde aus beiden Kulturen eine Probe entnommen und für den Immunoblot aufbereitet. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-NT-Antikörper markiert (α-Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α-Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt (α-Tec1/α-Cdc28). Angaben in Prozent.

Einzig *S. cerevisiae* TB50 wurde für weitere Experimente nicht berücksichtigt. Auch hier kann eine Abnahme der Tec1-Menge beobachtet werden, jedoch ist die Grundexpression von Tec1 zu gering, um eine korrekte Quantifizierung durchführen zu können. Damit war klar, dass es sich um einen Effekt handelt, der unabhängig vom genetischen Stammhintergrund greift, und Messungen daher in verschiedenen Stammhintergründen erfolgen können.

2.2.3. Die *TEC1*-Transkriptmenge wird durch Rapamycin nicht beeinflusst

Um zu ermitteln, ob das Absinken der Tec1-Proteinmenge seine Ursache in einem beschleunigten Abbau des Proteins oder in einer verringerten Expression des *TEC1*-Gens hat, wurde die *TEC1*-Transkriptmenge unter Einfluss von Rapamycin ermittelt. Dafür wurde die Gesamt-RNA aus einem *S. cerevisiae*-Wildtypstamm einer Northern-Hybridisierung unterzogen (Abb. 24 A). Hier zeigte sich eine stabile Expression von *TEC1* über 60 Minuten Rapamycinbehandlung. Die Quantifizierung ergab keine signifikante Zu- oder Abnahme der *TEC1*-Transkriptmenge. Um anschließend zu überprüfen, ob Rapamycin eventuell die Translation der *TEC1*-mRNA reguliert, wurde der Einfluss des Antibiotikums auf die Expression einer *TEC1(P)-lacZ*-Fusion bestimmt. Dazu wurde eine Fusion des *TEC1*-Promotors mit dem β -Galaktosidase-codierenden Bereich aus *E. coli* in einen *S. cerevisiae*-Wildtypstamm gebracht und die enzymatische Aktivität vor und während der Behandlung mit Rapamycin bestimmt. Die über mehrere Messungen gemittelten Ergebnisse zeigten eine leicht ansteigende Aktivität der β -Galaktosidase (Abb. 24 B).

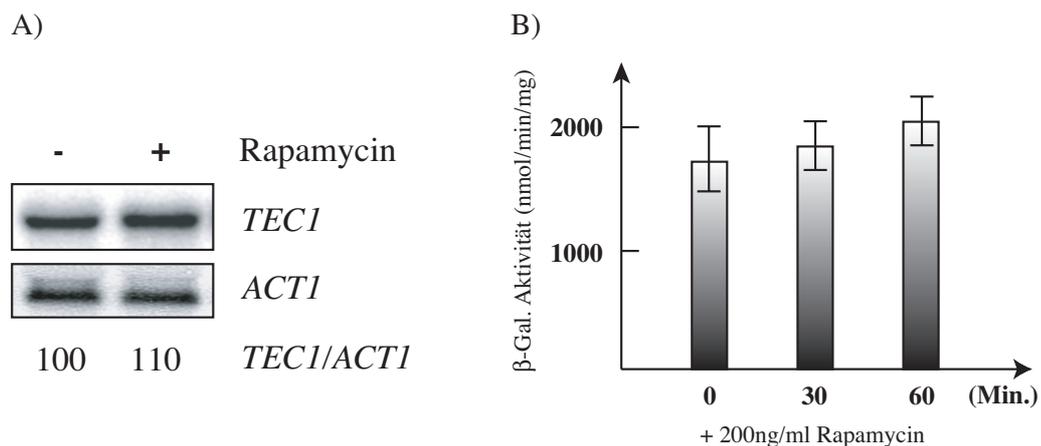


Abb. 24: Die Transkriptmenge von *TEC1* bleibt unter dem Einfluss von Rapamycin stabil.

A) Northern-Hybridisierung: Aus dem Wildtypstamm YHUM0271 wurde die Gesamt-RNA vor (-) und 60 Minuten nach Zugabe von 200 ng/ml Rapamycin (+) gewonnen. Die Transkriptmenge von *TEC1* (sowie *ACT1* als interner Kontrolle) wurde durch eine Northern-Analyse bestimmt und quantifiziert (*TEC1/ACT1*). Angaben in Prozent. B) *TEC1(P)-lacZ*-Aktivität: Aus dem Stamm YHUM0456 <BHUM0267> (*TEC1(P)::lacZ*) wurden vor sowie 30 und 60 Minuten nach Zugabe von 200 ng/ml Rapamycin Proben entnommen und die β -Galaktosidase-Aktivität photometrisch bestimmt.

Dies lässt vermuten, dass auch die Translation der *TEC1*-mRNA nicht durch Rapamycin beeinflusst ist und der Effekt der unter Rapamycin verminderten Tec1-Menge möglicherweise auf der Abnahme der Proteinstabilität basiert.

2.2.4. Rapamycin verringert die Stabilität des Tec1-Proteins

Um die Proteininstabilität von Tec1 unter dem Einfluss von Rapamycin beurteilen zu können, wurde ein Promotor-"Shut-off"-Experiment durchgeführt (Abb. 25).

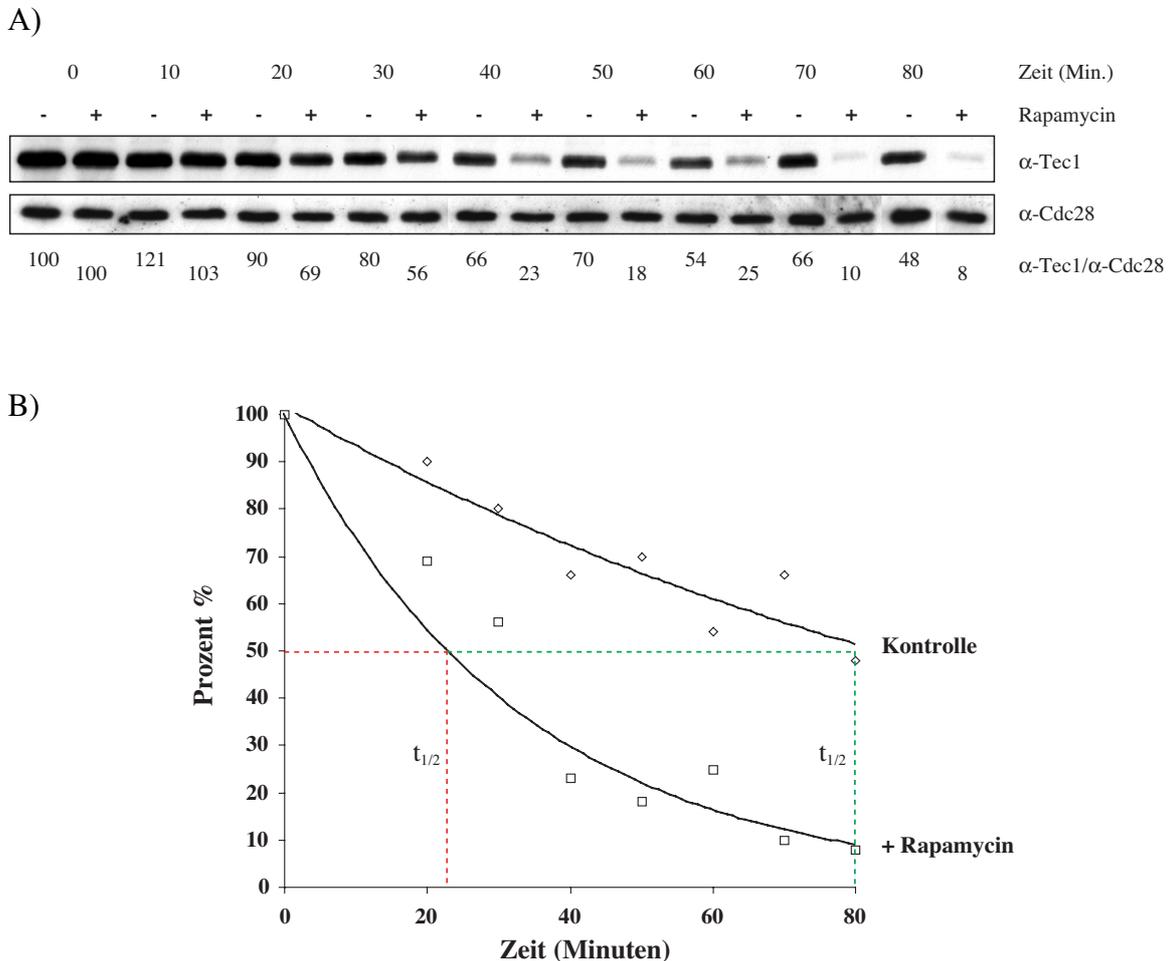


Abb. 25: Promotor-"Shut off"-Experiment mit *TEC1*.

A) Immunoblot nach dem *TEC1*-Promotor-"Shut off": Der Stamm YHUM0610 <BHUM0029> (*GALI(P)::TEC1::TEC1(T)*) wurde in SC + Galaktose bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ angezogen und die Expression von *TEC1* dann durch Zugabe von Glukose gestoppt (Zeitpunkt 0). Einer Kultur wurde danach 200 ng/ml Rapamycin zugegeben (+), einer zweiten Kontrollkultur nicht (-). Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-NT-Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße ist der Zeitpunkt 0 Minuten (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent. B) Graphische Auswertung des Promotor-"Shut off"-Experiments: Die Tec1-Proteinmenge in Prozent wurde gegen die verstrichene Zeit aufgetragen und eine Trendlinie eingefügt.

Dafür wurde das induzierbare Konstrukt *GALI(P)::TEC1*, welches den ORF von *TEC1* hinter dem induzierbaren *GALI*-Promotor trägt, in einen *tec1Δ* -Stamm transformiert. Der verwendete *GALI*-Promotor wird stark aktiviert, wenn Galaktose als einzige Kohlenstoff-Quelle angeboten wird, und innerhalb kurzer Zeit reprimiert, sobald der Zelle Glukose zur

Verfügung steht. Auf diese Weise wird ab dem Zeitpunkt des Promotor-"Shut-off", also der Zugabe von Glukose, keine mRNA von *TEC1* nachgeliefert. In einem Immunoblot wird die betrachtete Proteinmenge ihrer natürlichen Halbwertszeit folgend geringer werden. Der Vergleich dieses Abfalls mit dem in einer Vergleichskultur erlaubt eine Aussage über die Stabilität des Proteins unter den gemessenen Bedingungen.

In diesem Versuch wurden deshalb zum Zeitpunkt des Promotor-"Shut-off" 200 ng/ml Rapamycin zugegeben, nachdem die Kulturen zunächst in SC-Medium mit Galaktose gewachsen waren. Der Verlauf der Tec1-Proteinmenge wurde mit dem einer Kontrollkultur verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Ausgangsmengen an Tec1-Protein zu Beginn der Messungen identisch waren. Für die Kontrollkultur ohne Rapamycin ergab sich mit einer Halbwertszeit von ca. 80 Minuten ein Wert, der auch in anderen Arbeiten bereits ermittelt wurde (Chou *et al.*, 2004). Für die Kultur mit Rapamycin erhält man hingegen eine Halbwertszeit von knapp über 20 Minuten. Damit ist die Abnahme der Stabilität etwas weniger stark als unter dem Einfluss des α -Faktors (Chou *et al.*, 2004). Da die Halbwertszeit der mRNA von Transkriptionsfaktoren mit ca. fünf Minuten üblicherweise gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass nach spätestens 10 Minuten kein Protein mehr nachgebildet werden kann. Die signifikante Abnahme der Tec1-Proteinmenge beginnt in diesem Versuch jedoch erst kurz nach diesem Zeitpunkt. Das ist in diesem Zusammenhang besonders wichtig, da Rapamycin durch die Blockierung des TOR-Komplex 1 die Translation an verschiedenen Stellen blockiert. So hat der TOR-Komplex 1 Einfluss auf das 5'-mRNA-cap-Bindeprotein eIF4E (Barbet *et al.*, 1996; Danaie *et al.*, 1999), das Adapterprotein eIF4G (Berset *et al.*, 1998) und die Regulation der Translationsinitiation über eIF2 (Cherkasova und Hinnebusch, 2003; Kubota *et al.*, 2003), führt also insgesamt zu einer Hemmung der Translation. Die Ursache für die hier ermittelte Abnahme der Tec1-Proteinmenge ist demnach mit großer Wahrscheinlichkeit eine Verringerung der Stabilität des Tec1-Proteins durch Rapamycin.

2.2.5. Die Deletion des Gens für die Phosphatase Sit4 blockiert den Effekt von Rapamycin auf Tec1

Der Befund, dass Rapamycin die Stabilität von Tec1 verringert, legt die Vermutung nahe, dass Tec1 unter positiver Kontrolle des TOR-Komplexes 1 steht, da Rapamycin den TOR-Komplex 1 hemmt. Das Molekül bindet an FKBP12 ("FK506-binding protein") und hemmt dessen Isomerase-Aktivität (Heitman *et al.*, 1991; Koltin *et al.*, 1991). Dieser Verbund kann mit allen Proteinen des TOR-Komplexes 1 co-präzipitiert werden (Loewith *et al.*, 2002) und stört die Signaltransduktion des Multienzymkomplexes in bislang nicht genau bekannter Art. Um unter der Vielzahl an Möglichkeiten denjenigen Signalweg herauszufiltern, der für die Destabilisierung von Tec1 verantwortlich sein könnte, wurde

die Tec1-Stabilität in einer Reihe von *S. cerevisiae*-Mutantenstämmen überprüft. Sie trugen Deletionen in Genen von Komponenten der bekannten Signalwege unterhalb des TOR-Komplexes 1. Zunächst wurden dabei Stämme untersucht, bei denen Teile von Phosphatasemodulen des Typs 2A oder der 2A-ähnlichen Phosphatasen fehlten (siehe Einleitung). Diese Deletionen umfassten die Gene *TIP41* (kodiert für ein Regulatorprotein der TOR-Komplex 1-abhängigen Phosphatasemodule), *PPH21*, *PPH22* und *PPH3* (kodieren für die katalytischen Untereinheiten der PP2A), *SIT4* (kodiert für eine PP2A-verwandte und zu Pph21 und Pph22 homologe Proteinphosphatase), *RRD1* und *RRD2* (Genprodukte sind die PP2A- und Sit4-assoziierten, aktivierenden Proteine) sowie die Gene der SAPs, welche für die Spezifitätsfaktoren von Sit4 kodieren (Abb. 26).

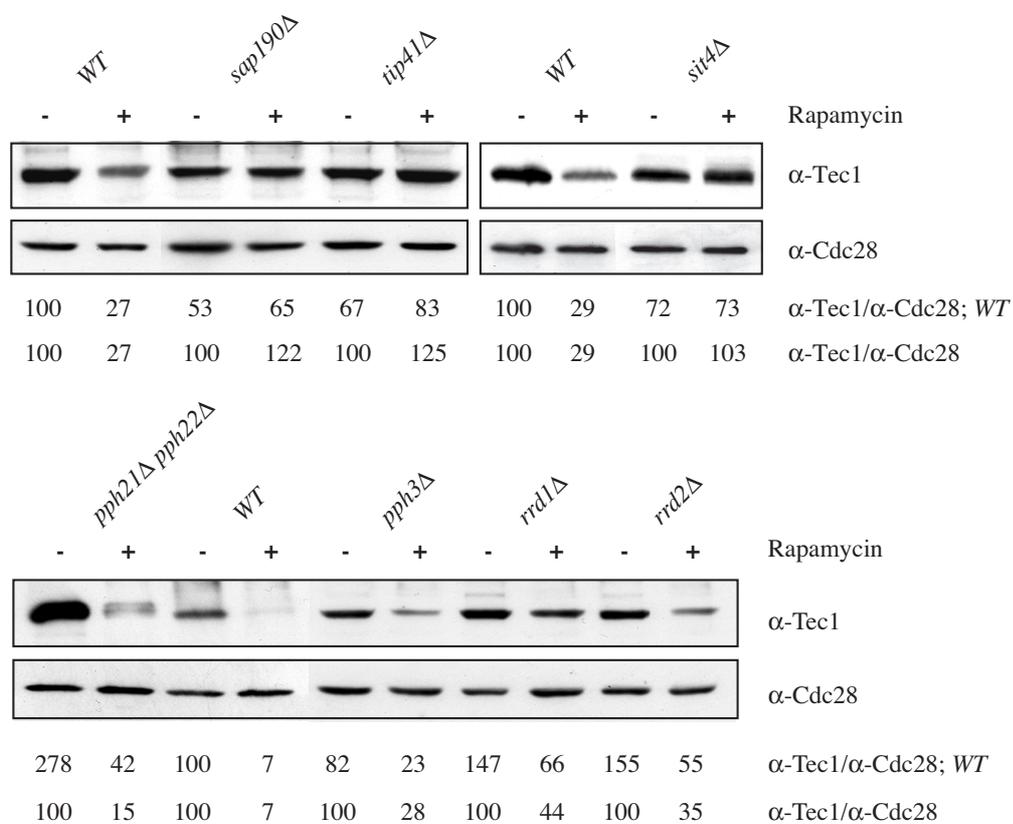


Abb. 26: Teile eines Phosphatasemoduls vermitteln die Destabilisierung von Tec1.

Immunoblot: Die Stämme YHUM0971 (WT, oben links), YHUM1389 (*sap190Δ*), YHUM1390 (*tip41Δ*), YHUM0271 (WT, oben rechts), YHUM1376 (*sit4Δ*), YHUM1357 (*pph21Δ pph22Δ*), YHUM1358 (WT, unten), YHUM1383 (*pph3Δ*), YHUM1384 (*rrd1Δ*) und YHUM1385 (*rrd2Δ*) wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) 200 ng/ml Rapamycin inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-NT-Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war der Wildtyp (α -Tec1/ α -Cdc28; WT) bzw. die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent.

Im Immunoblot zeigte sich, dass die Deletion von *TIP41* ebenso wie die von *SIT4* zu einer Stabilisierung von Tec1 führt. In beiden Fällen bleibt die Proteinmenge über den Versuchszeitraum von 75 Minuten konstant. Außerdem zeigte sich im *sap190*-Deletionsstamm eine Blockierung des Rapamycin-induzierten Effekts auf Tec1. In den Deletionsstämmen von *SAP4*, *SAP155* und *SAP185* war dies nicht der Fall (Daten nicht gezeigt). Da Pph21 und Pph22 redundante Funktionen aufweisen (Ronne *et al.*, 1991), wurde hier die Doppeldeletion getestet. Dabei zeigte sich, dass der Effekt des Rapamycins auf Tec1 zwar ebenso stark war wie im Wildtyp, die Ausgangsmenge Tec1 aber deutlich höher lag. In dem hier verwendeten genetischen Stammhintergrund W303 ist Tec1 normalerweise in geringeren Mengen als in $\Sigma 1278b$ nachweisbar. In der *pph21 pph22*-Doppeldeletion lag der Wert fast dreimal so hoch wie in der dazugehörigen Kontrolle. Die Deletion von *PPH3*, der dritten möglichen katalytischen Untereinheit der PP2A, zeigte dagegen kein vom Wildtyp abweichendes Verhalten. Die Deletion von *RRD1* oder *RRD2*, die für Aktivatoren der Phosphatase-Aktivität von Sit4 und PP2Ac kodieren, verhielten sich in Bezug auf die Tec1-Destabilisierung unter Rapamycin ebenfalls wie der Wildtyp. Das ist insofern von Interesse, als die Deletion dieser Proteine eigentlich zu einer verstärkten Resistenz gegenüber Rapamycin führen: "RRD" bedeutet "Resistant to Rapamycin Deletion" (Rempola *et al.*, 2000).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Destabilisierung von Tec1 nach Applikation von Rapamycin durch die Deletion von *TIP41*, *SIT4* oder *SAP190* blockierbar ist, nicht jedoch durch die Deletion anderer Faktoren der TOR-Komplex 1-kontrollierten Phosphatasemodule. Da sich die Signalverarbeitung unterhalb dieser Module stark verzweigt, sollte im Folgenden der Einfluss der wichtigsten Signaltransduktionswege auf Tec1 untersucht werden.

2.2.6. Die generelle Kontrolle der Aminosäurebiosynthese hat keinen Einfluss auf den Abbau von Tec1

Der Einfluss der generellen Kontrolle der Aminosäurebiosynthese (GAAC) auf die Rapamycin-vermittelte Destabilisierung von Tec1 wurde überprüft, weil Gcn2, die Sensor kinase dieses Systems, ein mögliches Regulationsziel von TOR-Komplex 1 ist. Dieser kann Gcn2 wahrscheinlich direkt phosphorylieren / inaktivieren und vermittelt abhängig von der PP2Ac und / oder Sit4 unter dem Einfluss von Rapamycin auch ihre Dephosphorylierung / Aktivierung (Cherkasova und Hinnebusch, 2003; Rohde *et al.*, 2004). Dies führt zu einer Hemmung der Initiation der Translation und damit zur translationellen Derepression des Transkriptionsfaktors Gcn4 (Hinnebusch, 1997; Hinnebusch und Natarajan, 2002; Hinnebusch, 2005). Hierfür wurden Deletionsstämme

der Gene der Sensorkinase Gcn2, des Transkriptionsfaktors Gcn4 und der Doppelmutante beider Faktoren in An- und Abwesenheit von Rapamycin überprüft (Abb. 27).

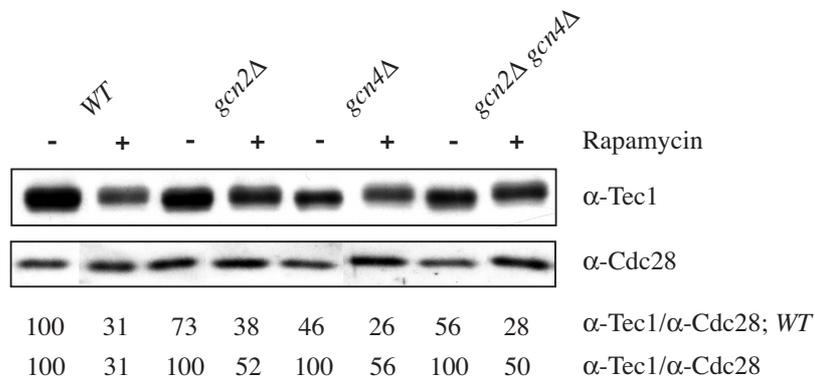


Abb. 27: Die Deletion von *GCN2* und *GCN4* bewirken einen abgeschwächten Effekt.

Die Stämme YHUM0910 (*WT*), YHUM0911 (*gcn2Δ*), YHUM0913 (*gcn4Δ*) und YHUM0915 (*gcn2Δ gcn4Δ*) wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) Rapamycin (Endkonzentration: 200 ng/ml) inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1 Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war der Wildtyp (α -Tec1/ α -Cdc28; WT) bzw. die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent.

Im Immunoblot zeigte der *gcn2*-Deletionsstamm einen leicht reduzierten Effekt des Rapamycins. Die Ausgangsmenge des Tec1-Proteins war geringer als im Wildtyp, gleichzeitig fiel die Reduktion von Tec1 aber schwächer aus. Nach 75 Minuten unter dem Einfluss von Rapamycin waren noch 52% des Tec1-Proteins vorhanden, also etwa 20% mehr als in der Wildtypkontrolle. Auch in dem Deletionstamm von *GCN4* und der *gcn2Δ gcn4Δ*- Doppelmutante war die Anfangsmenge Tec1 reduziert. Der Effekt des Rapamycins war auch hier weniger stark als in der Kontrolle. Die Menge des Tec1-Proteins sank auf rund die Hälfte der Ausgangsmenge ab. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das GAAC-System nicht an der Stabilisierung von Tec1 durch den TOR-Komplex 1 beteiligt ist.

2.2.7. Der Ras2 / cAMP-Signalweg wird für die Rapamycin-induzierte Regulation von Tec1 nicht benötigt

Als nächstes wurde mit dem Ras2 / cAMP-Signalweg ein Bereich untersucht, der ebenfalls als TOR-Effektor diskutiert wird (Schmelzle *et al.*, 2004; Kuranda *et al.*, 2006). Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten von *RAS2* und den Genen der katalytischen

Untereinheiten der PKA, den überwiegend redundanten *TPK1*, *TPK2* und *TPK3* vor und nach Applikation von Rapamycin überprüft. Von den katalytischen Untereinheiten waren dabei jeweils zwei deletiert, um den Effekt einer einzelnen katalytischen Untereinheit überprüfen zu können. Zu den TOR-Komplex 1-regulierten Proteinen zählen in diesem Zusammenhang auch die Kinasen Rim15 und Yak1. Rim15 wird antagonistisch von der PKA und dem TOR-Komplex 1 reguliert und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Eintritts in die stationäre Phase G0 (Wanke *et al.*, 2005). Yak1 wird TOR-Komplex 1-abhängig über die PKA reguliert und ist an der Aktivierung der Genexpression ribosomaler Proteine beteiligt (Martin *et al.*, 2004). Das Vorgehen bei den Messungen erfolgte analog zu den vorangegangenen Versuchen. Deletionsmutanten der genannten Faktoren wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen, 75 Minuten mit oder ohne 200 ng/ml Rapamycin inkubiert und anschließend im Immunoblot untersucht (Abb. 28).

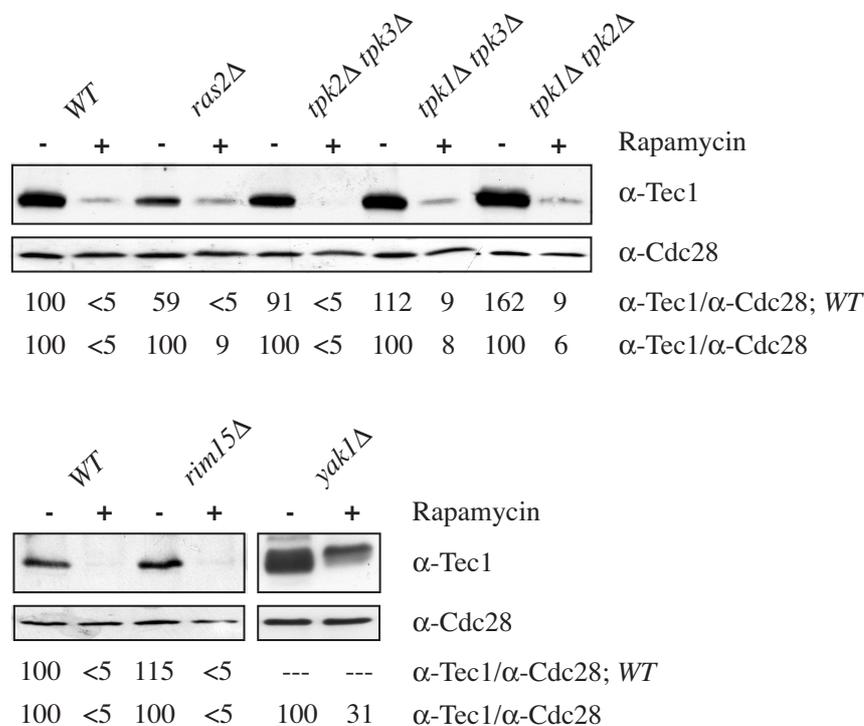


Abb. 28: Die Wirkung von Rapamycin auf Tec1 ist unabhängig vom Ras2/cAMP-Signalweg.

Die Stämme YHUM0119 (WT oben), YHUM0120 (*ras2Δ*), YHUM0407 (*tpk2Δ tpk3Δ*), YHUM0397 (*tpk1Δ tpk3Δ*), YHUM0389 (*tpk1Δ tpk2Δ*), YHUM1356 (WT unten), YHUM1355 (*rim15Δ*) und YHUM1157 (*yak1Δ*) wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) Rapamycin (Endkonzentration: 200 ng/ml) inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1 Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war der Wildtyp (α -Tec1/ α -Cdc28; WT) bzw. die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent.

Dabei zeigte sich nach Zugabe von Rapamycin in allen untersuchten Stämmen eine ebenso starke Verringerung der Tec1-Proteinmenge wie im Wildtypstamm. Die Destabilisierung des Tec1-Proteins konnte durch die Deletion von *RAS2* oder die Reduktion auf nur eine katalytische Untereinheit der PKA nicht blockiert werden. Die Deletion von *RAS2* führte zu einer geringeren Ausgangsmenge von Tec1-Protein, änderte jedoch nichts an der Regulation durch Rapamycin. Auch die Ausgangsmenge des Tec1-Proteins in den TPK-Deletionsstämmen unterschied sich geringfügig von der Kontrolle, das Resultat unter dem Einfluss von Rapamycin jedoch nicht. Ebenso verhielten sich die Deletionsmutanten von *RIM15* und *YAK1*. Das Tec1-Protein war ohne diese Kinasen ähnlich instabil wie im Kontrollstamm.

Um abschließend die Möglichkeit einer Regulation von Tec1 durch einen ausschließlich aktiven Ras2 / cAMP-Signalweg zu untersuchen, wurde das dominant aktive Allel *RAS2^{Val19}* in alle untersuchten Stämme transformiert. Es simuliert die Situation eines konstitutiv aktivierten Signalweges (Kataoka *et al.*, 1984). Damit wurde auch die Möglichkeit der Regulation durch Inhibition berücksichtigt. Die Western- und Northern-Hybridisierungen ergaben jedoch auch hier keine signifikanten Abweichungen vom Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Eine TOR-Komplex 1-abhängige Regulation von Tec1 über den Ras2 / cAMP Weg ist somit nicht wahrscheinlich.

2.2.8. Die Proteinkinase Npr1 und die HECT-Ubiquitinligase Rsp5 sind am Rapamycin-induzierten Abbau von Tec1 beteiligt

Die PP2A-verwandte Phosphatase Sit4 kontrolliert TOR-Komplex 1-abhängig einen Signaltransduktionsweg, der die Reaktion auf unterschiedliche Stickstoff- und Aminosäureangebote im Außenmedium bestimmt. Dieser "Nitrogen discrimination pathway" kontrolliert die Proteinkinase Npr1, die im inaktiven phosphorylierten Zustand einen Komplex aus der HECT-Ubiquitinligase Rsp5 und den beiden Ubiquitinligase-bindenden Proteinen Bul1 und Bul2 hemmt. Über diese Regulatoren und das Inhibitorprotein Ure2 werden verschiedene Aminosäure-Permeasen und die GATA-Transkriptionsfaktoren Gln3 und Gat1 kontrolliert (Crespo *et al.*, 2004; Tate *et al.*, 2006). Die Art der Regulation ist jedoch umstritten. Die Komponenten Npr1, Ure2, Bul1 und Bul2 dieses Signaltransduktionsweges wurden für weitere Untersuchungen herangezogen. Dafür wurden Stämme mit Deletionen der entsprechenden Gene analog zu den vorangegangenen Versuchen mit und ohne Einwirkung von Rapamycin im Immunoblot untersucht (Abb. 29). Dabei stellte sich heraus, dass die *npr1*-Deletion zu einer Abschwächung der Rapamycin-induzierten Destabilisierung des Tec1-Proteins führt. Die Deletion der Gene für die beiden Ubiquitin-bindenden Proteine Bul1 und Bul2 und des Inhibitor-Proteins Ure2 intensivierten dagegen diesen Effekt. Hier konnte nach 75 Minuten

unter dem Einfluss von Rapamycin im Immunoblot praktisch kein Tec1-Protein mehr nachgewiesen werden. Die Einzeldelektionen von *BUL1* und *BUL2* verhielten sich dagegen wie die Wildtyp-Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Da die Abschwächung des destabilisierenden Effekts des Rapamycins auf Tec1 durch die Deletion von *NPR1* eine mögliche Beteiligung dieses Signalsystems an der Regulation vermuten läßt, sollte der Einfluss der HECT-Ubiquitinligase Rsp5 auf Tec1 ebenfalls untersucht werden.

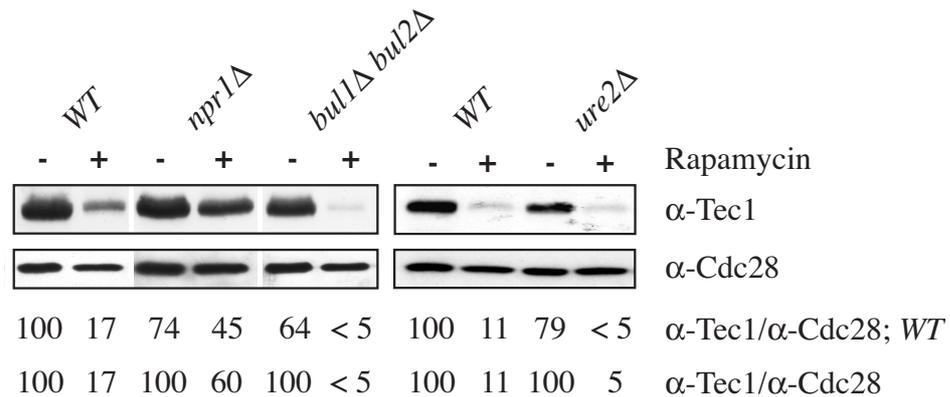


Abb. 29: Die Proteinkinase Npr1 beeinflusst Tec1 nach Zugabe von Rapamycin.

Immunoblot: Die Stämme YHUM0482 (*WT*, links), YHUM1089 (*npr1*), YHUM1093 (*bul1 bul2*), YHUM0910 (*WT*, rechts) und YHUM1195 (*ure2*) wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) Rapamycin (Endkonzentration: 200 ng/ml) inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war der Wildtyp (α -Tec1/ α -Cdc28; *WT*) bzw. die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent.

Rsp5 kontrolliert unter anderem die Lokalisation von Transkriptionsfaktoren (siehe unten) und die Stabilität verschiedener anderer Proteine (Horak, 2003). Da Rsp5 für *S. cerevisiae* ein essentielles Protein ist, kann der kodierende ORF nicht deletiert werden, ohne die entstehende Regulationslücke zu überbrücken. Der Grund seiner essentiellen Stellung ist die Regulation des Gens der $\Delta 9$ -Desaturase Ole1 (Hoppe *et al.*, 2000). Dieses Enzym wird in *S. cerevisiae* für die Produktion ungesättigter Fettsäuren benötigt und ist in seiner Funktion nicht ersetzbar. Es wird von den zwei homologen Transkriptionsfaktoren Spt23 und Mga2 kontrolliert. Diese verfügen in ihrer inaktiven Vorform über eine Transmembrandomäne, mit der sie in der Membran des endoplasmatischen Retikulums respektive der Kernhülle verankert sind. Für ihre Aktivierung werden Spt23 und Mga2 von Rsp5 polyubiquitiniert und anschließend vom 26S-Proteasom prozessiert. Dabei wird eine

verkürzte aktive Form der Transkriptionsfaktoren frei, die in den Kern einwandert und die Expression des *OLE1*-Gens aktiviert (Hoppe *et al.*, 2000) (Abb. 30).

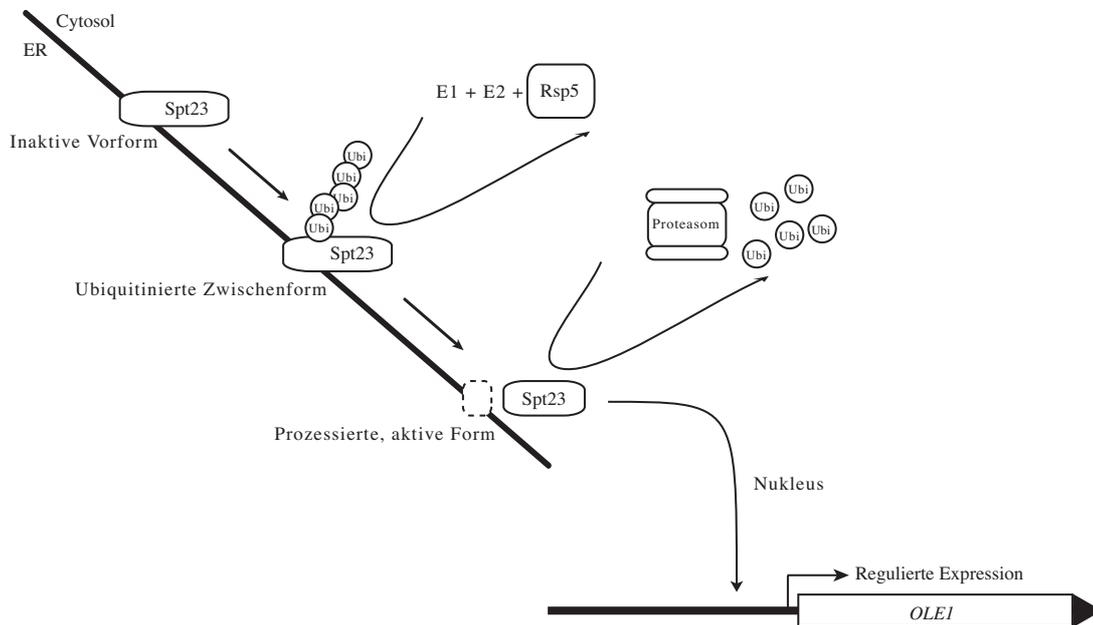


Abb. 30: Rsp5-vermittelte Regulation von *OLE1*.

Das Modell zeigt die Rsp5-abhängige Aktivierung des Gens der $\Delta 9$ -Desaturase Ole1. Der Transkriptionsfaktor Spt23 wird durch Ubiquitinierung und Prozessierung von einer ER-Membran-gebundenen Vorform in eine freie aktive Form überführt. Der aktive Transkriptionsfaktor wandert in den Zellkern und reguliert hier die Genexpression von *OLE1*. E1: Ubiquitin-aktivierendes Enzym; E2: Ubiquitin-konjugierendes Enzym; ER: Endoplasmatisches Retikulum; Ubi: Ubiquitin.

Die Strategie für eine Deletion bestand in der Umgehung der Abhängigkeit der *OLE1*-Genexpression von Rsp5. Der konstitutiv aktive Promotor des *URA3*-Gens wurde vor den ORF von *OLE1* kloniert und anschließend zusammen mit einem Selektionsmarker chromosomal integriert. In dem so entstandenen Stamm YHUM1104 wurde *RSP5* mit Hilfe der homologen Rekombination *in vivo* durch den Geneticin-418-Resistenzmarker *kanMX4* ersetzt. Die erfolgreiche Deletion wurde in einem Southern-Blot-Experiment überprüft (Abb. 31). Die ortsspezifische Rekombination führte zum Verlust einer *EcoRV*-Schnittstelle und im Southern-Blot-Experiment zu einer Verdoppelung der betrachteten Bandengröße. Der Ausgangsstamm YHUM1104 (*URA3(P)::OLE1*) und der heterozygote Stamm YHUM0903 (*rsp5::kanMX4/RSP5*), dessen DNS als Template zur Amplifikation der *kanMX4*-Kassette diente, wurden als Kontrolle verwendet. Da eine Vielzahl von Kolonien getestet wurde, waren bereits im Vorfeld potentielle Deletionsstämme durch PCR untersucht worden (Daten nicht gezeigt). Der *rsp5*-Deletionsstamm zeigt ein leicht eingeschränktes Wachstum auf Voll-, jedoch normales Wachstum auf Minimalmedium. Er

wurde für die folgenden Versuche verwendet, wobei der Ausgangsstamm YHUM1104 (*URA3(P)::OLE1*) als Kontrolle diente.

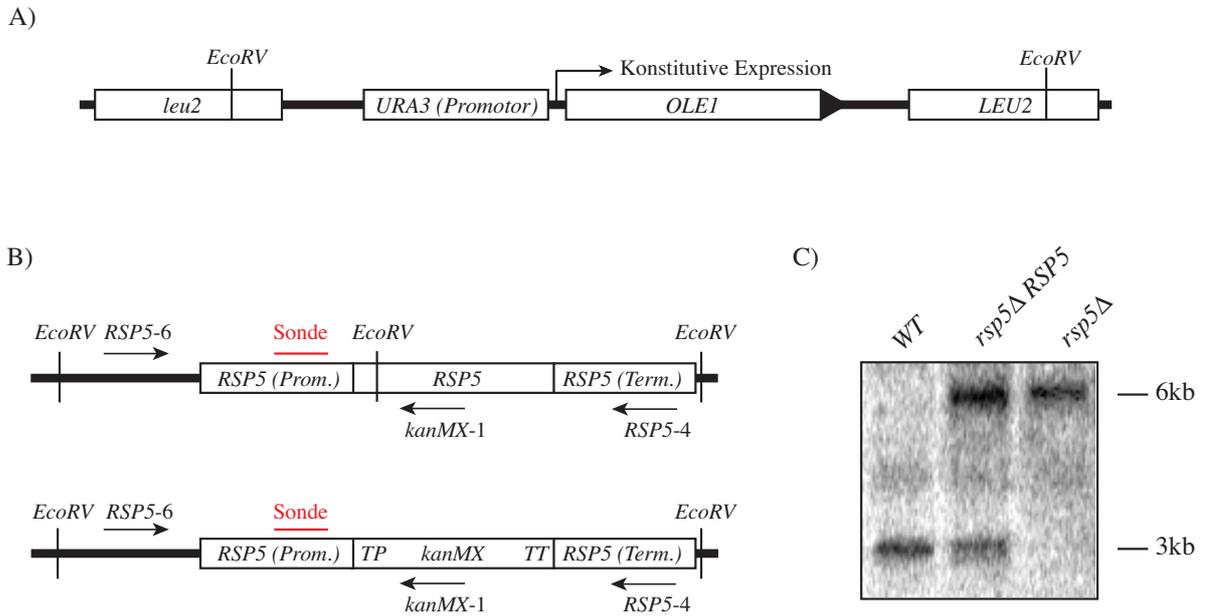


Abb. 31: Deletion eines essentiellen Gens: *rsp5Δ*

A) Die überlebenswichtige Expression des Gens der $\Delta 9$ -Desaturase Ole1 wurde durch einen konstitutiven Promotor sichergestellt. Die chromosomale Integration erfolgte am *LEU2*-Lokus und ergab den Stamm YHUM1104, dessen *OLE1*-Regulation von Rsp5 entkoppelt ist. B) In dem neu entstandenen Stamm wurde *RSP5* durch eine homologe Rekombination *in vivo* durch einen Geneticin-418-Resistenzmarker ersetzt (*kanMX4*). Die verwendeten Primer sind durch beschriftete Pfeile gekennzeichnet. C) Die erfolgreiche Deletion wurde in einem Southern-Blot-Experiment überprüft. Hier dienten der Ausgangsstamm YHUM1104 (*WT*) und der heterozygote Stamm YHUM0903 (*rsp5Δ RSP5*) als Kontrolle. YHUM1341 (*rsp5Δ*) zeigt im Autoradiogramm nur die Bande des Deletionsfragmentes.

Der neue Stamm wurde analog zu den vorangegangenen Versuchen auf die Tec1-Stabilität unter dem Einfluss von Rapamycin untersucht und dabei die *TEC1*-Genexpression mit der Tec1-Proteinmenge verglichen (Abb. 32). In der Northern-Hybridisierung zeigte sich danach eine im Vergleich zur Wildtypkontrolle leicht gesteigerte *TEC1*-Transkriptmenge, die aber analog zum Kontrollstamm keine signifikante Veränderung unter dem Einfluss von Rapamycin erfuhr. Im Immunoblot lag die Menge des Tec1-Proteins vor Zugabe von Rapamycin etwas unter der des Wildtypstammes, veränderte sich im Versuchsverlauf jedoch nicht mehr. Es zeigte sich eine fast vollständige Stabilisierung des Transkriptionsfaktors.

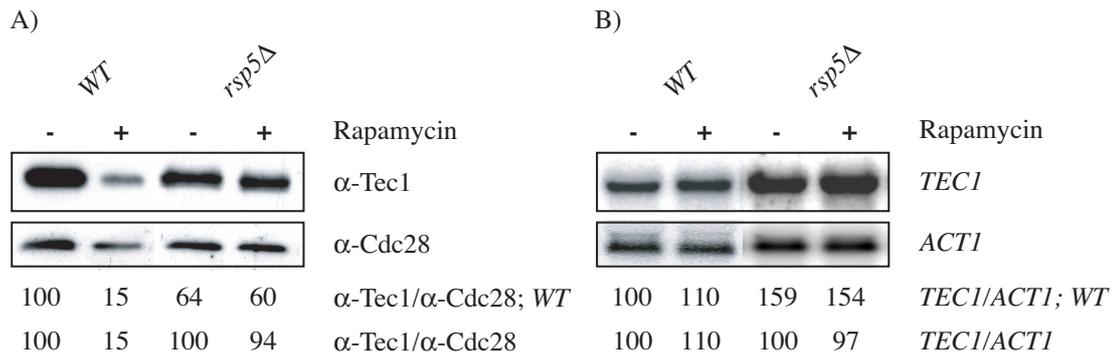


Abb. 32: Die *rsp5*-Deletion blockiert den Rapamycin-induzierten Abbau von Tec1.

A) Immunoblot der *rsp5*-Deletionsmutante: Die Stämme YHUM1104 (*WT*) und YHUM1341 (*rsp5Δ*) wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) Rapamycin (Endkonzentration: 200 ng/ml) inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war der Wildtyp (α -Tec1/ α -Cdc28; *WT*) bzw. die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent. B) Transkript-Analyse der *rsp5*-Deletionsmutante: Die Stämme YHUM1104 (*WT*) und YHUM1341 (*rsp5Δ*) wurden analog zu A) angezogen. Nach der Gewinnung der Gesamt-RNA wurde die Transkriptmenge von *TEC1* (sowie *ACT1* als interner Kontrolle) durch eine Northern-Hybridisierung bestimmt und quantifiziert (*TEC1/ACT1*). Angaben in Prozent.

Die Ergebnisse aus diesem Abschnitt haben also gezeigt, dass die Sit4-kontrollierte Protein-Kinase Npr1 und die HECT-Ubiquitinligase Rsp5 für den Rapamycin-induzierten Abbau von Tec1 notwendig sind.

2.2.9. Die Kernlokalisierung von Tec1 wird durch Rapamycin und Rsp5 nicht beeinflusst

Eine Möglichkeit für die Zelle, die Aktivität eines Proteins zu regulieren, ist es, dessen Lokalisation und damit die Verfügbarkeit für einen Vorgang zu verändern. Im Falle von Tec1 könnte das bedeuten, dass der Transkriptionsfaktor den Nukleus verlässt und im Zytoplasma einem verstärkten Abbau unterworfen wird. Den umgekehrten Weg verfolgt beispielsweise der Transkriptionsfaktor Gln3, der TOR-Komplex 1-abhängig von einem inaktiven Zustand im Zytoplasma zu einem aktiven im Nukleus gelangt und dort seine Zielgene reguliert (Beck und Hall, 1999). Die Regulation dieser Translokation soll durch die HECT-Ubiquitinligase Rsp5 vermittelt werden (Crespo *et al.*, 2004). Um einen ähnlichen Mechanismus für Tec1 zu überprüfen, wurde eine N-terminal GFP-markierte

Tec1-Variante in einem Wildtyp- und einem *rsp5*-Deletionsstamm exprimiert und in verschiedenen Wachstumsphasen mit und ohne Rapamycin untersucht (Abb. 33).

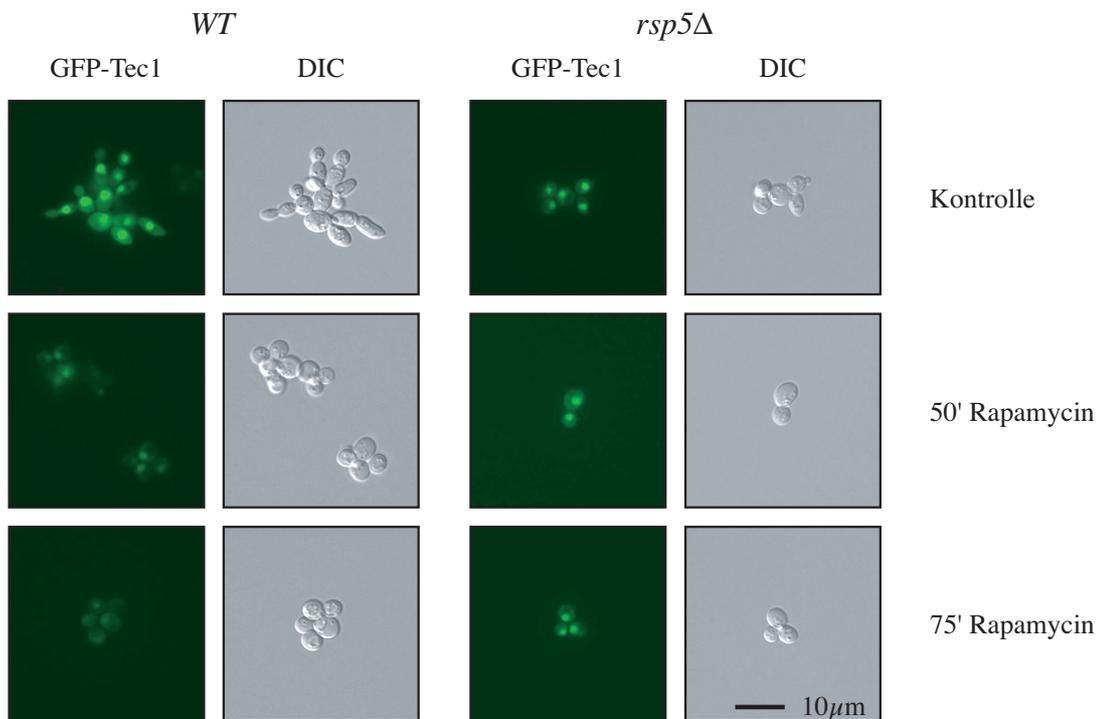


Abb. 33: Die Lokalisation von Tec1 wird in einer *rsp5Δ*-Mutante nicht beeinflusst.

Die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM0271 <BHUM0570> (WT *TEC1(P)::GFP-TEC1*) und YHUM1341 <BHUM0570> (*rsp5Δ TEC1(P)::GFP-TEC1*) wurden in "Low fluorescence medium" bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und insgesamt 75 Minuten mit oder ohne 200 ng/ml Rapamycin inkubiert. Vor Zugabe des Rapamycin (Kontrolle), nach 50 und nach 75 Minuten wurden Proben mikroskopiert. Normarski-Optik (DIC) und Fluoreszenz nach Anregung bei 395 nm (GFP-Tec1) derselben Zellen wurden gegenüber gestellt.

Der Wildtypstamm und das enthaltene GFP-Tec1 wurden zuvor in einem Adhäsionsassay auf Funktionalität im Hinblick auf das adhäsive Wachstum und die Reaktion nach Zugabe von Rapamycin überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass GFP-Tec1 adhäsives Wachstum ermöglicht und wie das Wildtypprotein unter dem Einfluss von Rapamycin abgebaut wird (Daten nicht gezeigt). Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab in Abwesenheit von Rapamycin sowohl im Wildtyp als auch in der *rsp5Δ*-Mutante eine Lokalisation des Transkriptionsfaktors im Zellkern. In den mit Rapamycin behandelten Wildtypzellen war GFP-Tec1 nach 50 Minuten bereits deutlich schwerer nachzuweisen. Nach 75 Minuten war praktisch kein GFP-Tec1 in der Fluoreszenzaufnahme sichtbar. Dies korreliert mit den Beobachtungen aus den vorangegangenen Immunoblot-Experimenten. Die Lokalisation von GFP-Tec1 im Nukleus zeigte dabei jedoch zu keinem Zeitpunkt Anzeichen einer Verschiebung, beispielsweise in das Zytoplasma. In der *rsp5*-Deletionsmutante befand sich

GFP-Tec1 wie im Wildtypstamm im Zellkern. Die Intensität der Fluoreszenz war vor Zugabe des Rapamycins etwas schwächer als in der Kontrolle, hatte sich 50 bzw. 75 Minuten nach dessen Applikation jedoch nicht maßgeblich verändert. Dieser Befund bestätigt das Ergebnis des Immunoblots (vgl. Abb. 32 und Abb. 33) und deutet darauf hin, dass Rsp5 an der Destabilisierung von Tec1 bei inaktivem TOR-Komplex 1 beteiligt ist. Zudem lässt es die Vermutung zu, dass diese Destabilisierung im Zellkern stattfindet, da zu keinem Zeitpunkt eine Akkumulation von GFP-Tec1 im Zytoplasma oder einem anderen Kompartiment sichtbar war.

2.2.10. Rsp5 interagiert mit Tec1 *in vitro*

Um einen direkten regulierenden oder modifizierenden Einfluss auf Tec1 haben zu können, müsste Rsp5 eine physikalische Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor eingehen können. Tatsächlich finden sich *in silico* im C-terminalen Abschnitt von Tec1 drei Prolin-x-Tyrosin-Bindemotive (P-x-Y), die von den in Rsp5 zentral lokalisierten WW-Domänen erkannt werden könnten (Abb. 34). Über genau diese Art von Motiv findet die Bindung und Regulation der Rsp5-Substrate Spt23 und Mga2 statt (Shcherbik *et al.*, 2004).

406 SRPV **P Y Y** KNNGMPYSLSKVRGR **P M Y** PRPAEDAYNANYIQGL **P Q Y** QTSYFSQLLL --- FY 486

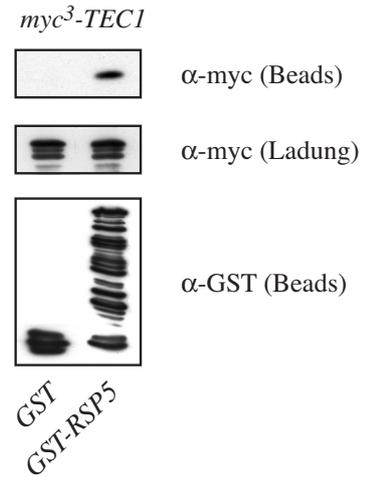
Abb. 34: Tec1 verfügt über drei Prolin-x-Tyrosin-Bindemotive für Rsp5.

Gezeigt ist ein Abschnitt der C-terminalen Aminosäuresequenz von Tec1. An den Positionen 411, 429 und 448 befinden sich P-x-Y-Motive, die in anderen Rsp5-Substraten essentiell für die Bindung der in Rsp5 enthaltenen WW-Domänen sind (Shcherbik *et al.* 2004).

Um eine mögliche Interaktion von Rsp5 und Tec1 nachzuweisen, wurden beide Proteine einer GST-Affinitätsreinigung unterzogen. Die E3-Ligase Rsp5 wurde dafür mit einem N-terminalen GST-Epitop markiert und mit einem induzierbaren *GALI*-Promotor versehen. Von Tec1 wurde eine konstitutiv exprimierte *myc*³-Fusion benutzt (Abb. 35). Die Ladekontrollen zeigen, dass sowohl *myc*³-Tec1 als auch GST-Rsp5 ausreichend stark exprimiert wurden. Nach der Affinitätsreinigung des Extraktes über Glutathion-Sepharose konnte neben dem GST-markierten Rsp5 auch Tec1 nachgewiesen werden. Der Transkriptionsfaktor und die Ubiquitinligase müssen also über eine physikalische Interaktion miteinander verbunden gewesen sein. Welche Bereiche beider Proteine für diese Interaktion verantwortlich sind und ob Rsp5 Tec1 direkt ubiquitinieren kann, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Abb. 35: Tec1 interagiert mit Rsp5 *in vivo*.

Immunoblot nach Co-Affinitätsreinigung: Die Stämme YHUM0610 <BHUM0768> <pYGEX-2T> (*myc³-TEC1 + GST*) und YHUM0610 <BHUM0768> <BHUM0765> (*myc³-TEC1 + GST-RSP5*) wurden unter induzierenden Bedingungen inkubiert, und der Gesamtproteinextrakt gewonnen. Es folgten eine GST-Affinitätsreinigung und der Immunoblot. Tec1-Protein, das nach Assoziation mit Rsp5 co-aufgereinigt wurde, ist im obersten Feld zu sehen (Beads). Darunter sieht man das geladene Tec1-Protein vor der Affinitätsreinigung (Ladung). Das unterste Feld zeigt die gereinigten GST-Fusionsproteine (Beads). GST-Rsp5 wurde durch einen polyklonalen anti-GST- (α -GST) und *myc³-Tec1* durch einen monoklonalen anti-*myc*-Antikörper (α -*myc*) nachgewiesen.



2.2.11. Die MAP-Kinasen der Bäckerhefe sind an der Regulation von Tec1 unter Rapamycin nicht beteiligt

Wie unter Abschnitt 2.1. dargestellt, verringert Fus3 nach Stimulation mit Pheromon die Stabilität von Tec1 durch die Phosphorylierung seines Serins 273. Obwohl der Fus3 / Kss1-MAPK-Signalweg bisher noch nicht als Effektorweg von TOR beschrieben wurde, sollte hier dennoch überprüft werden, ob der TOR-Komplex 1 die Stabilität von Tec1 eventuell über Fus3 regulieren kann. Dafür wurden Deletionsmutanten der Gene *KSS1*, *FUS3* und *STE7* sowie ein Stamm mit einer *kss1 fus3*-Doppeldeletion untersucht. Wie in den Versuchen zuvor wurden die verschiedenen Deletionsstämme in YEPD bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen, in zwei Fraktionen geteilt und für 75 Minuten mit Rapamycin bzw. dem Lösungsmittel versetzt. Der Proteinextrakt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Immunoblot-Verfahren untersucht (Abb. 36).

Hier zeigten sich nach der Zugabe von Rapamycin zwar deutlich unterschiedliche Ausgangsmengen von Tec1, jedoch keine signifikante Abschwächung der Destabilisierung. So lag in den *fus3*-Deletionsstämmen etwa 50% mehr Tec1 zu Beginn des Versuches vor als in der Wildtypkontrolle. In der Deletionsmutante von *STE7* war die Ausgangsmenge Tec1 dagegen um ca. 40% reduziert. Unter dem Einfluss des Rapamycins sank die Proteinmenge von Tec1 jedoch in allen Stämmen auf ungefähr ein Viertel der Ausgangsmenge ab.

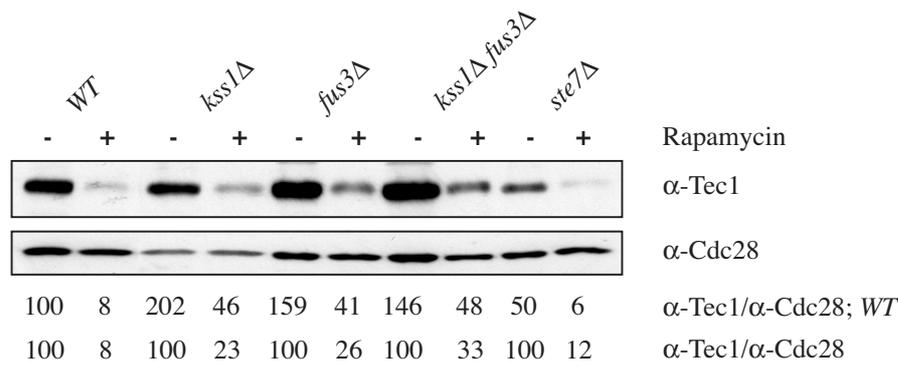


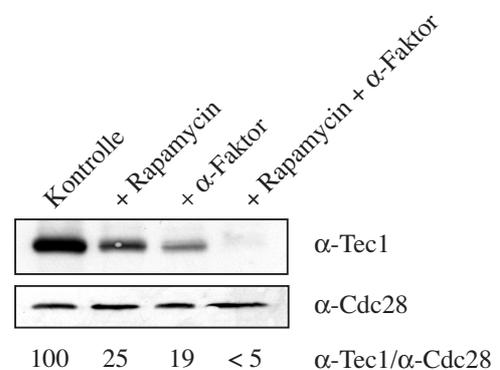
Abb. 36: Die MAPK Fus3 und Kss1 vermitteln keine Destabilisierung von Tec1 durch Rapamycin.

Immunoblot: Die Stämme YHUM0271 (WT), YHUM0677 (*kss1Δ*), YHUM0678 (*fus3Δ*), YHUM0679 (*kss1Δ fus3Δ*), YHUM0622 (*ste7Δ*), wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) Rapamycin (Endkonzentration: 200 ng/ml) inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war der Wildtyp (α -Tec1/ α -Cdc28; WT) bzw. die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent.

Demnach liegt die Ursache für die Abnahme der Tec1-Proteinmenge nicht an einer Fus3- oder Kss1-vermittelten Phosphorylierung wie bei Pheromon. Für unabhängige Mechanismen spricht auch der Befund, dass Rapamycin und α -Faktor das Tec1-Protein unterschiedlich stark, aber kumulativ beeinflussen. Gibt man beide Substanzen gleichzeitig für 75 Minuten zum Medium, verschwindet Tec1 praktisch quantitativ (Abb. 37).

Abb. 37: Rapamycin und α -Faktor wirken kumulativ.

Immunoblot: Der Stamm YHUM0271 wurde in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit Rapamycin (Endkonzentration: 200 ng/ml), α -Faktor (Endkonzentration: 1 μ M) oder beidem inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent.



Der Effekt für sich genommen war bei Pheromon etwas stärker als bei Rapamycin. Beide Substanzen zusammen zeigten einen additiven Effekt auf das Tec1-Protein.

Um die Möglichkeit der Regulation von Tec1 durch eine andere MAPK als Fus3 oder Kss1, aber nach einem ähnlichen Schema zu untersuchen, wurden auch Deletionsmutanten der übrigen drei MAPK der Hefe überprüft. Hog1 ist an der Osmoregulation der Zelle beteiligt (Brewster *et al.*, 1993). Bei Slt2 handelt es sich um die terminale Kinase des "Cell wall integrity"-Signalwegs, dessen Regulation durch die Protein-Kinase C1 vermittelt wird (Lee *et al.*, 1993), und Smk1 wird für sporulationsspezifische Prozesse wie die Bildung der äußeren Sporenhülle benötigt (Krisak *et al.*, 1994). Die Deletionsstämme dieser drei MAPK wurden, wie bereits zuvor beschrieben, mit Rapamycin behandelt, und ihr Einfluss auf Tec1 im Immunoblot untersucht (Abb. 38).

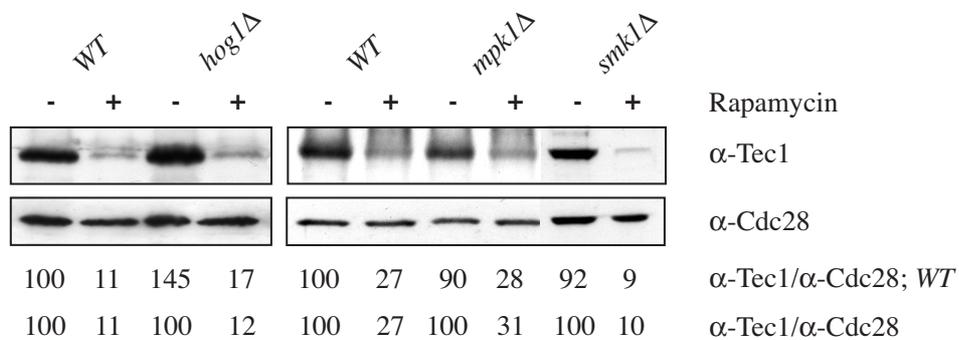


Abb. 38: Destabilisierung von Tec1 durch Rapamycin ist unabhängig von den MAPK Hog1, Mpk1 und Smk1.

Immunoblot: Die Stämme YHUM0272 (*WT links*), YHUM0451 (*hog1Δ*), YHUM0971 (*WT rechts*), YHUM1349 (*mpk1Δ*) und YHUM1391 (*smk1Δ*) wurden in YEPD bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) Rapamycin (Endkonzentration: 200 ng/ml) inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-Antikörper markiert (α -Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α -Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war der Wildtyp (α -Tec1/ α -Cdc28; *WT*) bzw. die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α -Tec1/ α -Cdc28). Angaben in Prozent.

Die destabilisierende Wirkung des Rapamycins konnte in allen untersuchten Stämmen nachgewiesen werden. Die *hog1*-Deletionsmutante enthielt dabei zu Versuchsbeginn etwa 40% mehr Tec1-Protein als die Wildtypkontrolle, wobei sich auch hier die Tec1-Menge im Versuchsverlauf auf unter 20% des Ausgangswertes verringerte. Die Deletionen von *MPK1* und *SMK1* verhielten sich wie der Wildtyp. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass die Verringerung der Tec1-Proteinstabilität unter dem Einfluss von Rapamycin unabhängig von den MAPK Fus3, Kss1, Hog1, Mpk1 oder Smk1 ist.

2.2.12. Identifizierung von weiteren E3-Ligasen, welche die Stabilität von Tec1 beeinflussen

Obwohl die HECT-Ubiquitinligase Rsp5 eine wichtige Rolle beim Rapamycin-induzierten Abbau von Tec1 zu spielen scheint, ist es denkbar, dass weitere Ligasen für Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine an dieser Regulation beteiligt sind. Um solche Faktoren zu identifizieren, wurde die Menge von Tec1 in einer Reihe von *S. cerevisiae*-Stämmen ermittelt, die Deletionen bekannter Gene für Ubiquitin-Ligasen, für das SUMOylierungs- oder das Urmyleerungssystems der Bäckerhefe tragen. Das Vorgehen erfolgte dabei analog zu den vorangegangenen Versuchen. Die Deletionsstämme ließen sich anhand der dabei auftretenden Effekte auf die Tec1-Proteinmenge vor und 75 Minuten nach Applikation von 200 ng/ml Rapamycin in drei Kategorien einteilen. Sie sind hier in Form von drei Tabellen dargestellt:

- 1) Mutationen ohne sichtbare Auswirkung (Tabelle 1).
- 2) Mutationen, die einen Einfluss auf den destabilisierenden Effekt von Rapamycin auf Tec1 haben (Tabelle 2).
- 3) Mutationen, welche die Tec1-Proteinmenge bei aktivem TOR-Komplex 1 beeinflussen, nicht jedoch den destabilisierenden Effekt durch Rapamycin (Tabelle 3).

In der ersten Klasse wurden 31 Gene für Komponenten verschiedener Protein-modifizierender Systeme identifiziert, deren Deletion die intrazelluläre Menge des Tec1-Proteins nicht beeinflusst. Dies gilt sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Rapamycin. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die entsprechenden Genprodukte nicht an der Stabilitätskontrolle von Tec1 beteiligt sind (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mutationen ohne sichtbare Auswirkung

Stamm	Mutation	Funktion des Genprodukts
YHUM1112	<i>apc9</i>	Untereinheit des "Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome" (APC/C) und E3-Ubiquitinligase
YHUM1115	<i>cdh1</i>	Zellzyklus-regulierter Aktivator des "Anaphase-promoting complex/cyclosome" (APC/C), dirigiert Ubiquitinierung von Zyklinen
YHUM1116	<i>cul3</i>	E3-Ubiquitinligase, gehört zur Familie der Culline
YHUM1117	<i>dcn1</i>	Putative Nedd8-Ligase und an der Neddylierung von Cullinen beteiligt
YHUM1119	<i>hrd1</i>	E3-Ubiquitinligase
YHUM1120	<i>hrd3</i>	E3-Ubiquitinligase
YHUM1121	<i>hrt3</i>	Putative kernlokalisierte E3-Ubiquitinligase mit Ähnlichkeiten zu F-Box-Proteinen des SCF
YHUM1122	<i>hul4</i>	Protein mit Ähnlichkeiten zu HECT-E3-Ubiquitinligasen

Fortsetzung Tabelle 1

Stamm	Mutation	Funktion des Genprodukts
YHUM1125	<i>mfbl</i>	F-Box-Protein des SCF
YHUM1127	<i>qri8</i>	Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2
YHUM1128	<i>rog3</i>	Bindet und reguliert die HECT-E3-Ubiquitinligase Rsp5
YHUM1129	<i>rup1</i>	Bindet und reguliert die HECT-E3-Ubiquitinligase Rsp5
YHUM1130	<i>swm1</i>	Untereinheit des "Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome" (APC/C) und E3-Ubiquitinligase
YHUM1131	<i>rri1</i>	Katalytische Untereinheit des COP9 Signalosoms (CSN). An der Neddylierung des SCF beteiligt
YHUM1132	<i>rri2</i>	Untereinheit des COP9 Signalosoms (CSN). An der Neddylierung des SCF beteiligt
YHUM1134	<i>rtt101</i>	Cullin
YHUM1135	<i>san1</i>	RING-E3-Ubiquitinligase, Degradation nukleärer Proteine
YHUM1136	<i>SKP2</i>	Putatives F-Box-Protein des SCF
YHUM1137	<i>ssm4</i>	RING-E3-Ubiquitinligase
YHUM1138	<i>tom1</i>	HECT-E3-Ubiquitinligase, reguliert transkriptionelle Coaktivatoren
YHUM1139	<i>tull</i>	RING-E3-Ubiquitinligase
YHUM1140	<i>ubr1</i>	E3-Ubiquitinligase
YHUM1141	<i>ubr2</i>	E3-Ubiquitinligase
YHUM1142	<i>ufd4</i>	HECT-E3-Ubiquitinligase
YHUM1143	<i>ufo1</i>	F-Box-Rezeptor-Protein, Untereinheit des SCF
YHUM1144	<i>yjl149w</i>	Putatives F-Box-Protein des SCF
YHUM1145	<i>ydr131c</i>	F-Box-Protein des SCF
YHUM1146	<i>ydr306c</i>	F-Box-Protein des SCF
YHUM1152	<i>siz1</i>	SUMO-E3-Ligase
YHUM1153	<i>siz2</i>	SUMO-E3-Ligase

Die Angaben der Spalte "Funktion" sind der "Saccharomyces Genome Database" entnommen:

<http://www.yeastgenome.org/>

Eine zweite Klasse von Mutationen umfasst vier Gene, deren Mutation ähnlich einer *rsp5*-Deletion zu einer Aufhebung der Destabilisierung von Tec1 durch Rapamycin führt. Es handelt sich dabei um Mutationen der Gene *CDC26*, *HUL5*, *YGL024w* und *CDC4*. Bei *CDC26*, *HUL5* und *YGL024w* resultieren die Deletionen bereits in Abwesenheit von Rapamycin in einem verringerten Proteinspiegel von Tec1, der unter Einfluss des Antibiotikums aber stabil blieb (Tabelle 2).

Im Falle des F-Box-Proteins Cdc4 führte die Inaktivierung des Gens in einem temperatursensitiven *cdc4^{ts}*-Stamm in Abwesenheit von Rapamycin zu einer leichten

Erhöhung der Tec1-Proteinmenge. Diese Ausgangsmenge blieb auch nach 75 Minuten mit Rapamycin im Medium stabil (Abb. 39).

Tabelle 2: Mutationen, die einen Einfluss auf den destabilisierenden Effekt von Rapamycin auf Tec1 haben

Stamm	Mutation	Funktion des Genprodukts	Tec1-Menge	
			- Rap.	+ Rap.
YHUM0971	-----	Wildtyp	++	o
YHUM1114	<i>cdc26</i>	Untereinheit des Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C)	+	+
YHUM1123	<i>hul5</i>	Protein mit Ähnlichkeiten zu HECT E3-Ubiquitinligasen	o	o
YHUM1133	<i>ygl024w</i>	ORF innerhalb von <i>PGDI</i> , Deletion beeinflusst das adhäsive Wachstum	+	+
YHUM1180	<i>cdc4^{ts}</i>	F-Box-Protein des SCF	+++	+++

Die Angaben der Spalte "Funktion" sind der "Saccharomyces Genome Database" entnommen: <http://www.yeastgenome.org/> Die Angaben in der Spalte "Tec1-Menge" beziehen sich auf die Menge des Tec1-Proteins in einem Wildtypstamm ohne Zugabe von Rapamycin (- Rap.): ++++ = > 150%; +++ = 120% - 150%; ++ = 80% - 120%; + = 40% - 80%; o = 10% - 40%; - = < 10%

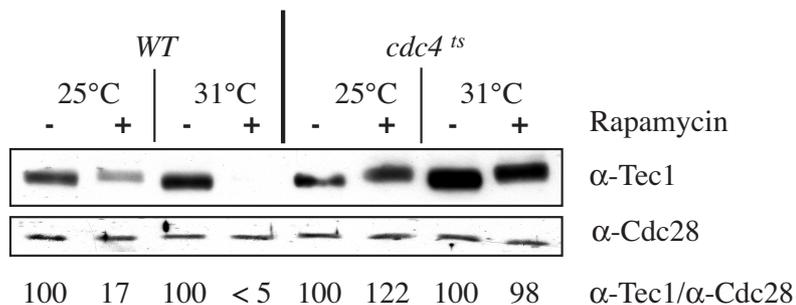


Abb. 39: Das F-Box-Protein Cdc4 wird für den Abbau von Tec1 benötigt.

Immunoblot eines temperatursensitiven Allels von *CDC4*: Die Stämme YHUM1179 (*WT*) und YHUM1180 (*cdc4^{ts}*) wurden bei 25°C in YEPD bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 angezogen. Anschließend wurden die Kulturen geteilt und 75 Minuten mit (+) oder ohne (-) 200 ng/ml Rapamycin, bei 25°C oder 31°C inkubiert. Der Proteinrohextrakt wurde im Immunoblot untersucht. Tec1 wurde durch einen polyklonalen anti-Tec1-Antikörper markiert (α-Tec1). Als interne Ladekontrolle diente das konstitutiv exprimierte Cdc28 (α-Cdc28). Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis von Tec1 zu Cdc28 ermittelt. Die Bezugsgröße war die Menge Tec1 ohne Zugabe von Rapamycin (α-Tec1/α-Cdc28). Angaben in Prozent.

Diese zweite Klasse von Deletionen ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit besonders interessant, da sie weitere mögliche Komponenten der Tec1-destabilisierenden Regulation bei inaktivem TOR-Komplex 1 enthalten könnte.

Eine dritte Klasse von Mutationen konnte die destabilisierende Wirkung des Rapamycins auf das Tec1-Protein zwar nicht blockieren, führte jedoch bereits im Vorfeld zu einer von der Wildtypkontrolle abweichenden Tec1-Menge, und zwar unabhängig von Rapamycin. Diese Gruppe umfasst insgesamt neun Gene, wobei die Deletion von *ASI3*, *PIB1*, *YLR224w*, *ASH1* und *UBS1* zu einem erhöhten und die Deletion von *DIA2*, *URM1*, *UBA4* und *BRE1* zu einem verminderten Tec1-Proteinniveau führen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mutationen, welche die Tec1-Proteinmenge bei aktivem TOR-Komplex 1 beeinflussen, nicht jedoch den destabilisierenden Effekt durch Rapamycin

Stamm	Mutation	Funktion des Genprodukts	Tec1-Menge	
			- Rap.	+ Rap.
YHUM0971	-----	Wildtyp	++	o
YHUM1113	<i>asi3</i>	Putative RING-E3-Ligase	+++	o
YHUM1126	<i>pib1</i>	RING-E3-Ligase	++++	o
YHUM1147	<i>ylr224w</i>	F-Box-Protein des SCF	+++	o
YHUM1148	<i>dia2</i>	F-Box-Protein des SCF	+	o
YHUM1149	<i>urm1</i>	Ubiquitin-ähnliches Protein, Urmlyierung	+	o
YHUM1150	<i>uba4</i>	Urm1-aktivierendes Protein, Urmlyierung	+	o
YHUM1159	<i>bre1</i>	RING-E3-Ligase	+	o
YHUM1160	<i>asi1</i>	Putative RING-E3-Ligase	+++	o
YHUM1161	<i>ubs1</i>	E2-Supressor-Protein	+++	o

Die Angaben der Spalte "Funktion" sind der "Saccharomyces Genome Database" entnommen:

<http://www.yeastgenome.org/> Die Angaben in der Spalte "Tec1-Menge" beziehen sich auf die Menge des Tec1-

Proteins in einem Wildtypstamm ohne Zugabe von Rapamycin (- Rap.): + + + + = > 150%;

+ + + = 120% - 150%; + + = 80% - 120%; + = 40% - 80%; o = 10% - 40%; - = < 10%

Gene dieser dritten Klasse könnten daher unter Standardbedingungen, wenn keine Nährstofflimitierung vorliegt und der TOR-Komplex 1 aktiv ist, ebenfalls an der Regulation des Transkriptionsfaktors beteiligt sein.

In welcher Art und durch welche Signalwege die Deletionen aus den Tabellen 2 und 3 die Tec1-Proteinmenge beeinflussen, muss in zukünftigen Arbeiten ermittelt werden.

3. DISKUSSION

3.1. Regulation von Tec1 durch Pheromon

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob Tec1 auf posttranslationaler Ebene einer Regulation durch den Pheromon-induzierten MAPK-Signalweg von *S. cerevisiae* unterliegt. Diese MAPK-Kaskade ist ein gutes Modellsystem für die molekularen Mechanismen der Signalspezifität in Eukaryoten. Ihre Spezifität kann beispielsweise durch das bevorzugte Binden einer spezifischen MAPK an ein "Scaffold"-Protein, die Unterscheidung zwischen dauerhafter und vorübergehender Aktivierung einer der beiden MAPK oder die kombinatorische Kontrolle von Transkriptionsfaktoren erreicht werden (Breitkreutz *et al.*, 2001; Madhani und Fink, 1997; Sabbagh *et al.*, 2001; Schwartz und Madhani, 2006). Hier konnte nun gezeigt werden, dass die unterschiedliche Regulation eines Programm-spezifischen Transkriptionsfaktors durch zwei MAPK, die beide mehr als nur ein zelluläres Programm kontrollieren, ein weiterer wichtiger Spezifitätsmechanismus ist. Eine Regulation dieser Art wurde bislang noch nicht beschrieben, obgleich die Regulation der Genexpression durch MAPK über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten bekannt ist (Yang *et al.*, 2003). Die Arbeit zeigt, wie der Transkriptionsfaktor Tec1 und die beiden MAPK Fus3 und Kss1 interagieren, um sowohl Signal- als auch Programmspezifität zu gewährleisten.

3.1.1. Die MAPK Fus3 und Kss1 regulieren Tec1 diametral

Es konnte gezeigt werden, dass Fus3 eine physikalische Interaktion mit Tec1 *in vivo* eingeht und in seiner aktiven Form in der Lage ist, Tec1 *in vitro* zu phosphorylieren. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass Tec1 ein direktes Regulationsziel von Fus3 ist. Die Phosphorylierung von Tec1 durch Fus3 impliziert eine direkte Interaktion beider Proteine. In einem indirekt entstandenen Verbund wäre dies nicht möglich gewesen. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache gestützt, dass die N-terminale Hälfte von Tec1, die für die Interaktion mit Fus3 ausreichend ist, zwei Sequenzbereiche mit starken Ähnlichkeiten zu dem konservierten MAPK-Bindemotiv (R/K)₂₋₃ - (X)₂₋₆ - L/I/V - X - L/I/V enthält (Bardwell *et al.*, 2001; Sharrocks *et al.*, 2000). Dieses Motiv findet sich jedoch nicht in allen bekannten Substraten von Fus3. Beispielsweise ist es im Zellzyklusinhibitor Far1 und dem Ste12-Regulatorprotein Dig1 enthalten, nicht jedoch in Ste12 selbst oder in Dig2 (Metodiev *et al.*, 2002). Ein exaktes, mit allen Fus3-Substraten übereinstimmendes Sequenzmotiv ist bislang nicht bekannt. Neben diesem möglichen Bindemotiv enthält der N-terminale Teil von Tec1 an der Position Threonin 273 eine potentielle MAPK-Phosphorylierungssequenz, die *in vitro* eine Modifikation durch Fus3 erfährt. Sie wird phosphoryliert. Das bedeutet, dass Tec1 nicht nur als neues Substrat von Fus3 identifiziert, sondern auch die genaue Position der dadurch vermittelten Regulation gefunden wurde.

Inzwischen wurde diese Phosphorylierung des Threonins 273 von Tec1 durch Fus3 und die damit verbundene Initiierung der Degradation des Transkriptionsfaktors von zwei weiteren Gruppen unabhängig bestätigt (Bao *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004).

Was könnte die physiologische Relevanz der Regulation von Tec1 durch Fus3 sein? Da die Tec1-abhängige Transkriptionsaktivierung von *CLNI* mit dem Pheromon-induzierten G1-Arrest des Zellzyklus interferieren könnte, ist die Bedeutung der Tec1-Destabilisierung möglicherweise hier zu suchen. Die MAPK Fus3 ermöglicht *S. cerevisiae* während des Einflusses von Pheromon eine negative Kontrolle von Tec1 durch Phosphorylierung und Destabilisierung. Diese Schlussfolgerung basiert auf der Beobachtung, dass sowohl die Inaktivierung von Fus3 (durch Deletion des Gens oder Einsatz der "Kinase-Dead"-Mutation Fus3^{K42D}) als auch die Zerstörung der potentiellen MAPK-Phosphorylierungssequenz Tec1 von der Regulation durch Pheromon entkoppelt. Die Phosphorylierung eines Transkriptionsfaktors als Werkzeug seiner Destabilisierung ist ein Regulationsmechanismus, der auch in Säugetieren bereits beschrieben wurde. Zum Beispiel führt die Phosphorylierung des Serin 294 in menschlichen Progesteronrezeptoren durch eine MAPK zu ihrer Degradation im 26S-Proteasom (Lange *et al.*, 2000). Interessanterweise stellte sich in *S. cerevisiae* in einer früheren Studie bereits heraus, dass die MAPKK-Kinase Ste11 ebenfalls in einem Fus3- und Pheromon-abhängigen Mechanismus destabilisiert wird (Breitkreutz *et al.*, 2001; Esch und Errede, 2002). Ein ähnlicher Ablauf wäre also möglicherweise auch hier für Tec1 denkbar. Tatsächlich sollen die beiden F-Box-Proteine Cdc4 und Dia2 an einer Ubiquitinierung von phosphoryliertem Tec1 nach der Einwirkung von Pheromon beteiligt sein und auf diese Art den Transkriptionsfaktor zum Abbau markieren. Die Bedeutung beider Faktoren wird jedoch kontrovers diskutiert (Bao *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004). Für Cdc4 als ausschlaggebendes F-Box-Protein spricht unter anderem eine als Cdc4-Phosphodegron (CDP) bezeichnete Bindesequenz, die sich um das phosphorylierte Threonin 273 ergibt. Sie folgt der Konsensussequenz I/L - I/L/P - T_(phosphoryliert) - P - (KR)₄, die effizient von Cdc4 gebunden wird (Nash *et al.*, 2001). Ob die Phosphorylierung durch Fus3 möglicherweise auch die Bindefähigkeit an TCS-Elemente oder die Assoziation von Tec1 mit Ste12 beeinträchtigt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Unklar war bislang auch, wie Kss1 die Aktivität von Tec1 regulieren könnte. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass nicht-phosphoryliertes Kss1 (z. B. in der Abwesenheit der aktivierenden MAPKK Ste7) die Transkription von *TECI* inhibiert und dass diese Hemmung vom *TECI*-Promotor abhängig ist. Diese Beobachtungen werden von einer Reihe bereits zuvor bekannter Fakten gestützt:

- 1) Nicht-phosphoryliertes Kss1 hemmt die Ste12-vermittelte Transkription (Bardwell *et al.*, 1998).

- 2) Aktives Kss1 wird für die Ste12-abhängige Transkription benötigt (Elion *et al.*, 1991; Sabbagh *et al.*, 2001).
- 3) Die Transkription von *TEC1* steht unter direkter Kontrolle von Ste12 (Köhler *et al.*, 2002).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass Kss1 die Tec1-Proteinmenge hauptsächlich über die Ste12-abhängige *TEC1*-Genexpression steuert. Auch hier wurden in Säugetieren bereits ähnliche Mechanismen der Regulation von Transkriptionsfaktoren durch MAPK beschrieben. Beispielsweise sind BMK1 (ERK5) und Isoformen der MAPK p38 über den Transkriptionsfaktor MEF2C stimulationsabhängig an der Regulation des *c-jun*-Promotors beteiligt (Han *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 1997). Kss1 könnte jedoch Tec1 auch noch auf posttranslationaler Ebene über eine Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor regulieren. Frühere Studien konnten einen Komplex aus Kss1, Ste12 und Tec1 *in vivo* nachweisen (Ho *et al.*, 2002) und eine direkte Interaktion von Ste12 mit Tec1 sowohl *in vitro* (Madhani und Fink, 1997 b) als auch *in vivo* (Chou *et al.*, 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch aufgrund der folgenden Beobachtungen gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Kss1 und Tec1 indirekter Natur und eine direkte Regulation von Tec1 durch Kss1 daher unwahrscheinlich ist:

- 1) Die *in vivo*-Interaktion von Kss1 und Tec1 ist abhängig von Ste12.
- 2) Kss1 ist nicht in der Lage, Tec1 *in vitro* zu phosphorylieren.
- 3) Der C-terminale Abschnitt von Tec1, der für die Interaktion mit Kss1 verantwortlich ist, zeigt keine Sequenzähnlichkeiten zu MAPK-Bindemotiven.

Außerdem umfasst diese C-terminale Sequenz den selben Bereich, der für die Interaktion von Tec1 mit Ste12 essentiell ist (Chou *et al.*, 2006). Diese Daten lassen eine Art Brückenfunktion von Ste12 zwischen Kss1 und Tec1 vermuten, erlauben aber auch die Möglichkeit der Regulation eines Ste12/Tec1-Komplexes durch Kss1. Tatsächlich hängt die vollständige Aktivierung der Tec1-Zielgene sowohl von Ste12 als auch von der C-terminalen Hälfte von Tec1 ab (Köhler *et al.*, 2002; Zeitlinger *et al.*, 2003). Die Rolle von Kss1 ist in diesem Zusammenhang aber nicht abschließend geklärt.

Die bestehende Vorstellung der funktionellen Aufteilung des Transkriptionsfaktors Tec1 konnte mit diesen Resultaten um drei Bereiche erweitert werden (Abb. 40):

- 1) Der N-terminale Bereich des Proteins (Aminosäure 1-280) ist für eine direkte Interaktion mit der MAPK Fus3 ausreichend.
- 2) Das Threonin 273 kann posttranslational von Fus3 durch Phosphorylierung modifiziert werden.

- 3) Der C-terminale Bereich von Tec1 (Aminosäure 281-486) vermittelt eine Ste12-abhängige Interaktion mit der MAPK Kss1.

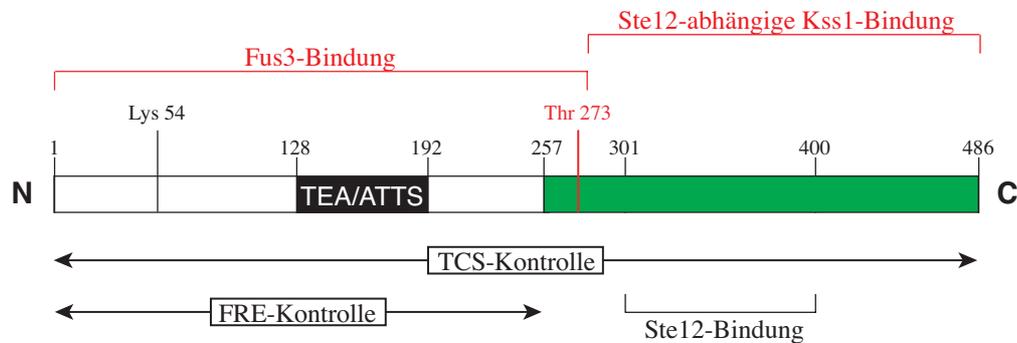


Abb. 40: Erweiterte Domänenstruktur von Tec1.

Die rot dargestellten Bereiche erweitern das bisherige Modell: Die N-terminale Hälfte des Tec1-Proteins (Aminosäure 1-280) ist für die Bindung der MAPK Fus3 notwendig. Die Aminosäure Threonin der Position 273 kann von ihr phosphoryliert werden. Das dadurch gebildete Cdc4-Phosphodegron (Chou *et al.*, 2004) führt zu einem raschen Abbau des Tec1-Proteins. Der C-terminale Abschnitt von Tec1 (Aminosäure 281-486) wird für die Ste12-abhängige Interaktion mit Kss1 benötigt.

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Regulation von Tec1 durch die MAPK Fus3 und Kss1 offensichtlich einem gegenläufigen Prinzip folgt. Während Kss1 durch die Aktivierung von Ste12 für eine Intensivierung der *TEC1*-Transkription sorgt, kann Fus3 durch Phosphorylierung des Threonin 273 die Degradation des Transkriptionsfaktors initiieren. Damit ergibt sich die Frage, wie die Programmspezifität bei aktivierten MAPK erfolgen könnte.

3.1.2. Die Signalspezifität unter dem Einfluss von Pheromon wird durch wechselnde Aktivierungsstärke der MAPK Fus3 und Kss1 erreicht

Das Ergebnis einer negativen Regulation von Tec1 durch Fus3 als Reaktion auf Pheromon könnte auf die Art der Kontrolle der Programmspezifität in *S. cerevisiae* hindeuten. Eine Reihe von unterschiedlichen Interaktionen zwischen zwei MAPK und zwei Transkriptionsfaktoren gewährleistet dabei die spezifische Aktivierung von zwei verschiedenen Entwicklungsprogrammen. In diesem Modell hängt die Programmspezifität von Stärke und Dauer der Aktivierung der MAPK Fus3 und Kss1 ab (Abb. 41). In Abwesenheit eines aktivierenden Signals liegt Kss1 überwiegend nicht-phosphoryliert vor und verhindert die Ausprägung beider Programme durch Inhibition des

Transkriptionsfaktors Ste12 und dadurch die Expression von Genen des adhäsiven Wachstums (z. B. *TEC1*, *FLO11*) oder der Konjugation (z. B. *FUS1*). Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Genexpression von *TEC1* durch einen Ste12-unabhängigen Promotor ausreichend ist, um die Repression des adhäsiven Wachstums in Abwesenheit von Ste7 zu umgehen. Allerdings muss man hier darauf hinweisen, dass der Status "Kein Signal" artifiziell durch genetische Inaktivierung von *STE7* erreicht wurde. Es handelt sich somit nicht um einen physiologischen Zustand (Cook *et al.*, 1997).

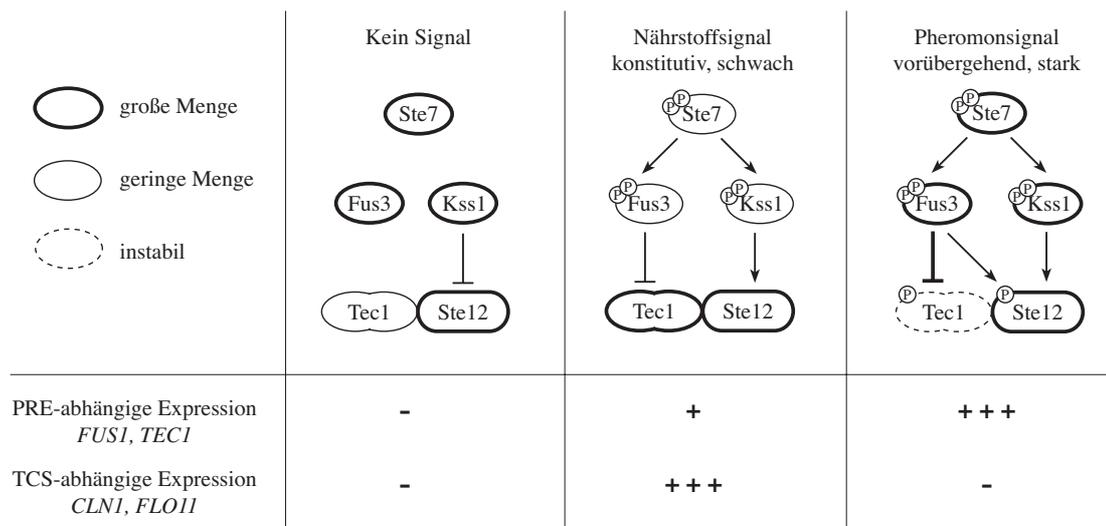


Abb. 41: Modell der Regulation von adhäsivem Wachstum und Konjugation.

In Abwesenheit eines Signals reprimieren verhältnismäßig große Mengen von inaktivem Kss1 die Ste12-abhängige Genexpression. Die hieraus resultierende geringe Menge Tec1 kann die TCS-vermittelte Genexpression nicht effektiv aktivieren. Ein schwaches konstitutives Signal, wie es durch Nährstoffe ermöglicht werden könnte, führt nur zu kleinen Mengen phosphorylierter MAPK. Die Aktivität von Ste12 reicht danach aber aus, um die Genexpression von *TEC1* und die TCS-abhängige Aktivierung adhäsionsspezifischer Gene zu erreichen, nicht jedoch die der konjugationsspezifischen Gene. Die geringe Menge an phosphoryliertem Fus3 reicht nicht aus, um Tec1 wirkungsvoll zu inhibieren. Ein starkes Pheromonsignal zieht dagegen große Mengen phosphorylierter MAPK nach sich. Ste12 ist aktiv, Tec1 wird jedoch durch Fus3 wirkungsvoll destabilisiert. Dadurch kommen die PRE-abhängigen konjugationsspezifischen Gene zur Ausprägung und das TCS-vermittelte adhäsive Wachstum unterbleibt.

Der nächste Schritt des Modells beschreibt ein schwaches, aber konstitutives Signal, welches ausreicht, um geringe Mengen Kss1 und Fus3 zu phosphorylieren und damit adhäsives Wachstum, aber keine Konjugation zu ermöglichen. Auf molekularer Ebene wird die Programmspezifität dabei durch zwei Prozesse erreicht:

- 1) Die Menge an aktivem Ste12 reicht aus, um die Genexpression und Autoregulation von *TEC1*, nicht aber der konjugationsspezifischen Gene zu ermöglichen.
- 2) Die geringen Mengen an aktivem Fus3 reichen nicht aus, um Tec1 wirkungsvoll durch Phosphorylierung zu destabilisieren.

Der dritte Zustand des Modells benötigt ein starkes aktivierendes Signal, z. B. die Exposition gegenüber Pheromon, und ermöglicht das Umschalten vom adhäsiven Wachstum zur Konjugation. Zwei Bedingungen ermöglichen diesen Status:

- 1) Durch große Mengen von aktivem Kss1 und Fus3 werden ebenfalls große Mengen von aktivem Ste12 frei, die für die Aktivierung konjugationsspezifischer Gene sorgen können.
- 2) Tec1 wird durch aktives Fus3 effizient an der Position Threonin 273 phosphoryliert und damit zur Degradation markiert. Eine Tec1 abhängige Aktivierung adhäsionsspezifischer Gene unterbleibt daher.

Dieses Modell baut auf einer Reihe von Beobachtungen vergangener Studien auf, nach denen die Signalspezifität der MAPK durch vorübergehende oder nachhaltige Aktivierung sowie eine kombinatorische Kontrolle der Transkription erfolgt (Breitkreutz *et al.*, 2001; Madhani und Fink, 1997; Sabbagh *et al.*, 2001). Es erweitert die bestehenden Modelle und weist auf die physiologische Relevanz eines Schalter-ähnlichen Mechanismus für die zugrunde liegende Programmspezifität hin. Offensichtlich ist die Inhibierung von Tec1 während der Konjugation notwendig, um die Tec1-abhängige Expression des G1-Zyklins Cln1 zu unterbinden und damit einen effizienten Zellzyklusarrest zu ermöglichen. Interessanterweise wird nur die Tec1-Proteinmenge, nicht aber die *TEC1*-Transkriptmenge vorübergehend gesenkt. Das Aufrechterhalten der *TEC1*-Transkription stellt möglicherweise einen schnellen Anstieg der Tec1-Proteinmenge am Ende des Konjugationsprogramms sicher. Damit würde die Initiierung eines neuen Zellteilungszyklus beschleunigt. Im Falle einer Nährstofflimitierung wäre Tec1 außerdem für die Ausbildung des filamentösen Wachstums nötig (Gavrias *et al.*, 1996; Mösch und Fink, 1997). Die vorübergehende Hemmung eines programmspezifischen Transkriptionsfaktors auf Protein-, nicht aber auf Transkriptionsebene könnte einen generellen Mechanismus in Eukaryoten darstellen. Dies wäre eine Möglichkeit, nicht nur die Signalspezifität zu erreichen, sondern auch um eine schnelle Anpassung verschiedener Entwicklungsprogramme an die bestehenden Bedingungen zu ermöglichen.

3.2. Regulation von Tec1 durch den TOR-Signalweg

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welcher Art Tec1 durch bestimmte Nährstoffe und Nährstoff-gesteuerte Signalwege reguliert wird. Generell reagiert *S. cerevisiae* auf unzureichende Nährstoffversorgung durch Anpassung der Stoffwechselaktivitäten. Anabolische Prozesse werden gedrosselt und Komponenten von Transport- und Synthesewegen der Grundversorgung werden verstärkt exprimiert. Das völlige Fehlen eines essentiellen Nährstoffs führt dagegen zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase und der Ausbildung einer stationären Phase (G0), in der die Mangelsituation überdauert werden kann. Hier konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Tec1 einer Kontrolle durch Stickstoff und den TOR-Komplex 1 unterliegt. Dabei wird die Tec1-Stabilität abhängig von der Phosphatase Sit4 und der HECT-Ubiquitinligase Rsp5 reguliert.

3.2.1. Die Stabilität von Tec1 unterliegt einer TOR-Komplex 1-abhängigen Regulation

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Limitierung der Stickstoff- oder Aminosäureversorgung sowie die Applikation von Rapamycin oder Koffein in *S. cerevisiae* zu einer stark verringerten Proteinmenge des Transkriptionsfaktors Tec1 führt. Allen diesen Bedingungen gemeinsam ist ihr Einfluss auf den TOR-Komplex 1. Die mangelnde Versorgung der Zelle mit Aminosäuren oder Stickstoff hemmt die Aktivität des TOR-Komplex 1 in bislang nicht bekannter Weise (Cardenas *et al.*, 1999; Hardwick *et al.*, 1999; Komeili *et al.*, 2000), und die Zugabe von Rapamycin oder Koffein führt zu einer direkten Inhibition der TOR-Kinasen (Heitman *et al.*, 1991; Reinke *et al.*, 2006). Dies führt zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Barbet *et al.*, 1996; Cardenas und Heitman, 1995; Heitman *et al.*, 1991) und der Aktivierung zellulärer Programme, um der tatsächlichen oder vermeintlichen Unterversorgung zu begegnen (Barbet *et al.*, 1996; Cardenas *et al.*, 1999; Hardwick *et al.*, 1999). Da sich der Verlust von Tec1 durch Rapamycin induzieren lässt, unterliegt der Transkriptionsfaktor mit großer Wahrscheinlichkeit einer Regulation durch den TOR-Komplex 1. Nur in diesem Komplex werden die TOR-Kinasen von Rapamycin inhibiert, der TOR-Komplex 2 ist davon nicht betroffen (Loewith *et al.*, 2002). Als Folge eines inaktivierten TOR-Komplex 1 kommt es in einer Vielzahl von zellulären Signalwegen zu sehr unterschiedlichen Formen der Regulation. Es wurden sowohl Beispiele für transkriptionelle und translationelle Kontrolle als auch für die Regulation der Proteininstabilität von Zielproteinen des TOR-Komplex 1 beschrieben (Berset *et al.*, 1998; Cardenas *et al.*, 1999; Hinnebusch, 2005). Die Überprüfung des Effektes von Rapamycin auf Tec1 ergab jedoch weder Hinweise auf eine

Verringerung der Transkriptmenge noch auf eine Regulation der *TEC1*-Translation. Im Gegensatz dazu war aber die Stabilität des Tec1-Proteins nach Zugabe von Rapamycin vermindert. Die Transkriptmenge von *TEC1* war auch 60 Minuten nach Zugabe von Rapamycin noch konstant und bestätigte damit die Resultate eines Transkriptprofils der Bäckerhefe unter dem Einfluss von Rapamycin (Düvel *et al.*, 2003). Mit diesem Ergebnis konform geht auch die Auswertung eines *TEC1(P)::lacZ*-Reporterkonstrukts, die eine leichte Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität ergab. Das deutet sowohl auf eine stabile Transkription als auch auf eine stabile Translation hin. Zusammen mit dem Resultat der forcierten Abnahme der Tec1-Proteinmenge in einem "Shut off"-Experiment nach Zugabe von Rapamycin lässt sich die Schlussfolgerung ableiten, dass die Inaktivierung des TOR-Komplex 1 zu einer Verringerung der Proteinstabilität von Tec1 führt.

3.2.2. Die PP2A-verwandte Phosphatase Sit4 vermittelt die Destabilisierung des Tec1-Proteins bei inaktivem TOR-Komplex 1

Die vorliegenden Resultate zeigen, dass sich die Stabilität des Transkriptionsfaktors Tec1 unter dem Einfluss von Rapamycin abhängig von den Proteinen Tip41, Sit4 und Sap190, die Komponenten eines TOR-Komplex 1-regulierten Phosphatasemoduls sind, verringert. Wie könnte die Regulation von Tec1 durch diese Proteine vermittelt werden? Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde (siehe auch 1.4.2.1 und Abb. 11), reguliert der TOR-Komplex 1 die Aktivität der Phosphatase Sit4 über die Regulatorproteine Tap42 und Tip41. Ist der TOR-Komplex 1 aktiv, so befindet sich Sit4 zusammen mit Tap42 und Rrd1 in einem Komplex. Die Phosphataseaktivität von Sit4 ist in diesem Verbund inhibiert. Eine Inaktivierung des TOR-Komplexes 1 durch Nährstoffmangel oder Rapamycin führt zu einer verstärkten Interaktion von Tap42 mit dem Regulatorprotein Tip41. Dadurch löst sich der Phosphatasekomplex um Sit4 von Tap42 und wird aktiv (Abb. 42).

Der Befund dieser Arbeit, dass in *sit4*- und *sap190*-Deletionsstämmen Tec1 auch unter dem Einfluss von Rapamycin stabil bleibt, unterstützt die Hypothese, dass die von Sap190-abhängige Phosphataseaktivität von Sit4 direkt oder indirekt das Tec1-Protein destabilisiert. Der Befund, dass eine *tip41*-Deletion ebenfalls zu einer Stabilisierung von Tec1 führte, lässt sich dadurch erklären, dass in Abwesenheit von Tip41 auch bei inaktivem TOR-Komplex 1 Tap42 noch in der Lage ist, Sit4 zu binden und zu inaktivieren. Durch das Fehlen von Tip41 funktioniert der "Feedback-Loop" nicht mehr, der die Assoziation von Tap42 mit Sit4 vermindert (Jacinto *et al.*, 2001). Der Sit4-Rrd1-Komplex bleibt damit weiter an Tap42 gebunden und inaktiviert. Dabei entsteht faktisch die gleiche Situation wie in der *sit4*-Deletionsmutante, die den Effekt von Rapamycin auf Tec1 ebenfalls blockiert.

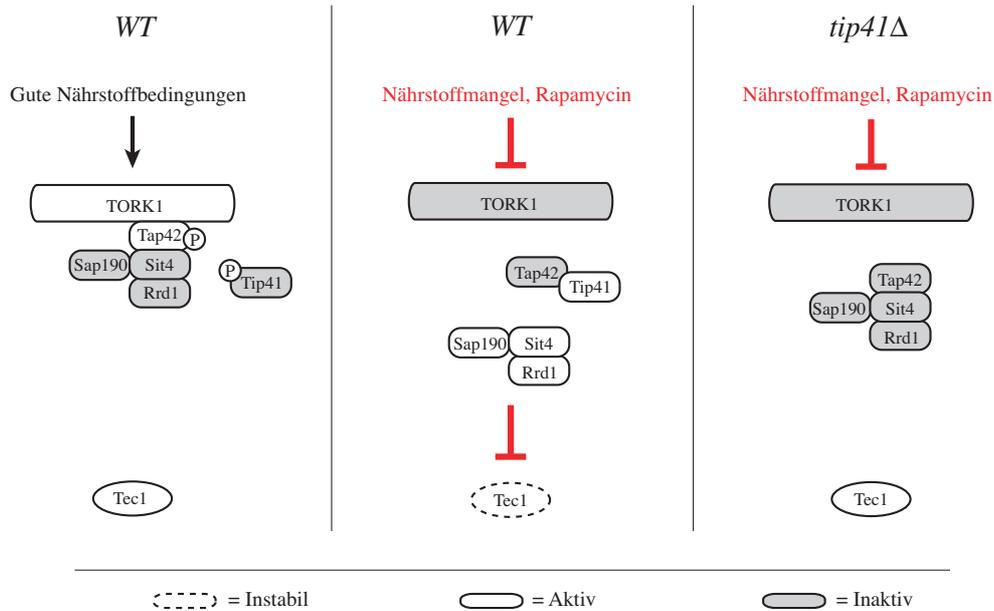


Abb. 42: Modell der Sit4-abhängigen Destabilisierung von Tec1.

Dargestellt ist ein Modell derjenigen Komponenten TOR-Komplex 1-gesteuerter Phosphatasemodule, die eine Rapamycin-induzierte Destabilisierung von Tec1 vermitteln. Der TOR-Komplex 1 wird durch Rapamycin inhibiert. Das Regulatorprotein Tip41 bindet Tap42, welches die Phosphatase Sit4 aus seinem inhibitorischen Verbund entlässt. Zusammen mit seinem assoziierten Protein Sap190 vermittelt Sit4 daraufhin die Destabilisierung von Tec1. In einem *tip41*-Deletionsstamm unterbleibt die Aktivierung der Phosphatase, da der inhibitorische Verbund mit Tap42 möglicherweise nicht vollständig gelöst wird. Das Phosphatase-assoziierte Protein Rrd1 ist für diese Regulation anscheinend nicht von essentieller Bedeutung.

Dieses Modell ist nicht im Detail belegt, erklärt aber den Befund, dass eine *tip41*-Deletion die Phosphatase-abhängigen TOR-Komplex 1-Effektorwege von der Regulation durch Rapamycin entkoppelt (Jacinto *et al.*, 2001; Santhanam *et al.*, 2004).

3.2.3. Teile eines Stickstoff-Katabolit-Repression-Signalweges regulieren Tec1

Durch welche unterhalb von Sit4 liegenden Signalwege könnte Tec1 reguliert werden? Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Elemente eines Signaltransduktionsweges der Stickstoff-Katabolit-Repression, und zwar die Proteinkinase Npr1 und die HECT-Ubiquitinligase Rsp5, involviert sind. Hier wurde eine Blockierung der Rapamycin-induzierten Destabilisierung von Tec1 durch Deletionen der entsprechenden Gene nachgewiesen. Wie könnten diese Faktoren die Aktivität von Tec1 regulieren? Anhand der vorliegenden Daten können zur Beantwortung dieser Frage prinzipiell drei unterschiedliche Signalverläufe diskutiert werden (Abb. 43).

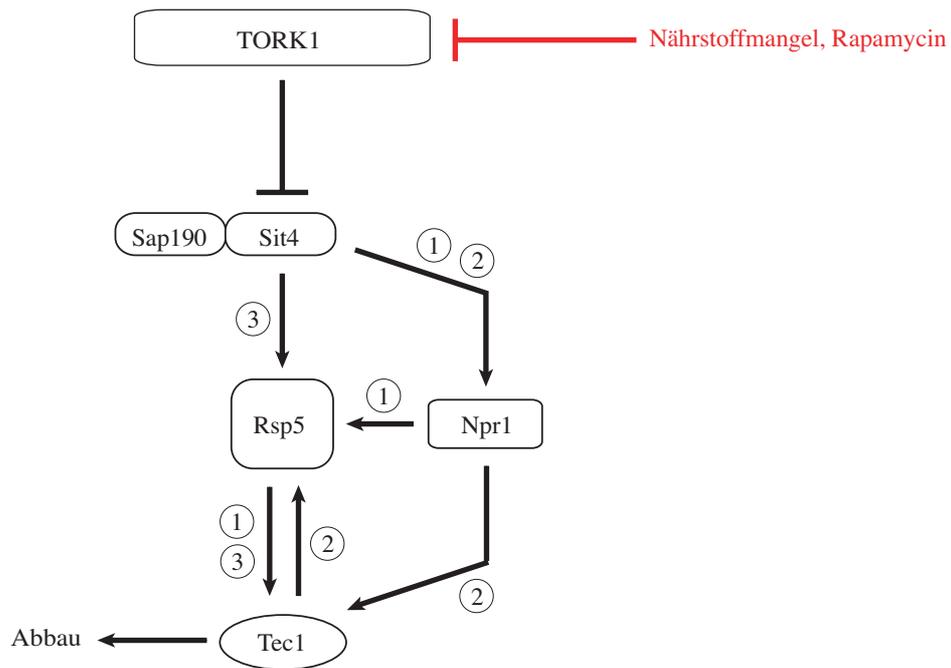


Abb. 43: Regulationsmodell für Tec1 durch Npr1 und die HECT-Ubiquitinligase Rsp5.

Abgebildet ist ein genetisches Modell der Regulation von Tec1 bei inaktiviertem TOR-Komplex 1. Die Phosphatase Sit4 und ihr assoziiertes Protein Sap190 sind unter diesen Bedingungen aktiv. Die verschiedenen Regulationsvarianten innerhalb des Modelles sind mit Nummern versehen, welche die verschiedenen Möglichkeiten des Informationsflusses anzeigen (detailliertere Angaben hierzu finden sich im Text): 1) Npr1 wird aktiviert und stimuliert Rsp5, welches daraufhin Tec1 destabilisiert. 2) Aktives Npr1 phosphoryliert Tec1 und markiert es so für die Ubiquitinierung durch Rsp5. 3) Rsp5 wird unabhängig von Npr1 aktiv und erkennt bzw. ubiquitiniert Tec1.

Nährstoffmangel führt zur Inhibition des TOR-Komplex 1 und damit zur Aktivierung der Phosphatase Sit4 und ihres assoziierten Proteins Sap190. Als mögliche Folgen für Npr1 und Rsp5 kommen in Betracht:

- 1) Npr1 wird dephosphoryliert und damit aktiviert. Dies führt zu einer Aktivierung von Rsp5, welches Tec1 daraufhin bindet und durch Ubiquitinierung destabilisiert.
- 2) Npr1 wird dephosphoryliert und damit aktiviert. Aktives Npr1 phosphoryliert Tec1 und markiert es so für die Bindung und Ubiquitinierung durch Rsp5.
- 3) Rsp5 wird unabhängig von Npr1 aktiviert und erkennt/ubiquitiniert Tec1.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Sit4 die Aktivität von Rsp5 und Npr1 steuern kann. Die Aktivität von Npr1 wird dabei direkt durch die Phosphatase Sit4 reguliert (Jacinto *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1998). Npr1 liegt bei aktivem TOR-Komplex 1 phosphoryliert, d. h. in seiner inaktiven Form vor. In diesem Zustand hat es einen inaktivierenden Effekt auf Rsp5 (Crespo *et al.*, 2004). Diese inhibierende Wirkung von Npr1 fehlt nach seiner Aktivierung durch Sit4 und wird möglicherweise durch eine stimulierende Wirkung auf Rsp5 ersetzt. Aktives Rsp5 beeinflusst dann z. B. direkt oder indirekt die Kernlokalisation

des Transkriptionsfaktors Gln3 (Crespo *et al.*, 2004; Tate *et al.*, 2006). Im Falle von Tec1 ist ein ähnlicher Mechanismus denkbar, allerdings scheint hier Rsp5 nicht die Kernlokalisation, sondern die Stabilität des Transkriptionsfaktors zu kontrollieren. Wie könnte diese Stabilitätskontrolle von Tec1 durch Rsp5 vermittelt werden? Mehrere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine direkte Interaktion der beiden Proteine:

- 1) Tec1 verfügt über drei P-x-Y-Motive, die von Rsp5 gebunden werden können. Dieses Motiv allein ist ausreichend, um ein Protein effektiv zu erkennen, zu ubiquitinieren und so dem Abbau im 26S-Proteasom zuzuführen (Saeki *et al.*, 2005).
- 2) Tec1 und Rsp5 gehen *in vivo* eine Interaktion ein.
- 3) Eine Tec1-Mutante, die ab Aminosäure 355 deletiert ist, und der damit die P-x-Y-Motive fehlen, blockiert die Rapamycin-induzierte Destabilisierung von Tec1 (Kern, 2006).

Ob Rsp5 das Tec1-Protein über eine Ubiquitinierung kontrolliert, muss in Zukunft untersucht werden. Hier sollte zunächst die Ubiquitinierung von Tec1 in An- bzw. Abwesenheit von Rsp5 und/oder Rapamycin untersucht werden. Die mögliche Ubiquitinierung von Tec1 in Abhängigkeit von Rsp5 und Rapamycin könnte z. B. durch die Verwendung einer Proteolyse-resistenten Ubiquitinvariante (z. B. Ubiquitin^{K48R, G76A} (Finley *et al.*, 1994)) überprüft werden. Zusätzlich könnten die drei P-x-Y-Motive von Tec1 durch Punktmutationen zerstört werden, um ihre Relevanz für die Proteinstabilität zu ermitteln. Ebenfalls ungeklärt sind die Funktionen der Rsp5-assoziierten Proteine Rup1, Ubp2, Bul1 und Bul2. Ihr Zusammenspiel bestimmt die Art der Ubiquitinierung und damit auch die Art des Signals. Hier könnten weitere Interaktionsstudien von Rup1, Ubp2, Bul1 und Bul2 mit Tec1 hilfreich sein. Die Deletionen von *RUP1*, *BUL1* und *BUL2* zeigen keine hemmenden Effekte auf den Tec1-Abbau bei inaktiviertem TOR-Komplex 1. Der Einfluss von Ubp2 muss in diesem Zusammenhang noch überprüft werden. Weiterhin wäre es denkbar, dass Rsp5 die Stabilität von Tec1 unabhängig von seiner Ubiquitinligase-Funktion reguliert. Dies könnte z. B. durch Inaktivierung der enzymatischen Aktivität von Rsp5 mittels einer Punktmutation des Cysteins 777 (Wang *et al.*, 1999) überprüft werden. Falls eine solche Variante den Rapamycin-induzierten Abbau von Tec1 zulässt, würde dies auf eine E3-unabhängige Funktion von Rsp5 hindeuten.

Eine weitere Möglichkeit der TOR-Komplex 1-abhängigen Stabilitätskontrolle von Tec1, die aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine direkte Phosphorylierung von Tec1 durch Npr1. Die bisher bekannten Substrate von Npr1 sind die Aminosäure-Permeasen Bap2, Gap1 und Tat2, wobei ihre Phosphorylierung durch Npr1 sowohl Degradationssignal wie auch Schutz vor Abbau sein kann (De Craene *et al.*, 2001; Omura und Kodama, 2004; Schmidt *et al.*, 1998). Allerdings sind bislang

keine Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch Npr1 bekannt, aus denen sich bioinformatische Hinweise auf Tec1 als mögliches Substrat ergeben könnten. Daher müssen erst zukünftige Experimente zeigen, ob Npr1 den Transkriptionsfaktor direkt phosphorylieren kann und ob diese Npr1-abhängige Phosphorylierung Tec1 für eine Interaktion mit Rsp5 markiert und dadurch destabilisiert.

Eine dritte Möglichkeit wäre eine Sit4-abhängige, aber Npr1-unabhängige Regulation von Rsp5. Diese Variante ergibt sich aus dem Befund, dass Tec1 in einer *rsp5*-Deletionsmutante vollständig stabilisiert wird, wohingegen in einer *npr1*-Deletionsmutante nur eine partielle Stabilisierung des Transkriptionsfaktors zu beobachten war. Die Spekulation einer weiteren parallel zu der von Npr1 vermittelten Regulation von Rsp5 durch den TOR-Komplex 1 ergibt sich aus folgenden Hinweisen: Die Proteinkinase Snf1, die als TOR-Antagonist diskutiert wird (De Virgilio und Loewith, 2006), unterliegt einer negativen Kontrolle durch den TOR-Komplex 1 (Orlova *et al.*, 2006), und Rsp5 kann *in vitro* durch Snf1 phosphoryliert und damit reguliert werden (Ptacek *et al.*, 2005). Ob diese Modifikation unter dem Einfluss von Rapamycin tatsächlich vorgenommen wird und welche Auswirkung sie auf Rsp5 hat, ist nicht bekannt. Hier könnte in Zukunft eine *snf1*-Deletionsmutante oder eine *snf1Δ npr1Δ*-Doppelmutante untersucht werden, um einen etwaigen Einfluss auf die Tec1-Regulation zu ermitteln.

Um zwischen diesen drei Regulationsmöglichkeiten zu unterscheiden, müssen in Zukunft weitere Untersuchungen durchgeführt werden, insbesondere biochemische Analysen, welche die *in vivo*- und *in vitro*-Interaktionen zwischen den verschiedenen Proteinen genau beleuchten.

3.3. Vergleich der Pheromon-induzierten und der Nährstoff-abhängigen Regulation von Tec1

3.3.1. Signalwege und Abbau des Tec1-Proteins

Eine wichtige Erkenntnis aus dieser Arbeit ist der Befund, dass die Destabilisierung des Tec1-Proteins durch Pheromon auf der einen und durch Rapamycin auf der anderen Seite durch unterschiedliche Mechanismen erreicht wird. Diese Schlussfolgerung ergibt sich aufgrund des Befundes, dass Pheromon und Rapamycin additiv auf die Destabilisierung von Tec1 wirken (Abb. 44).

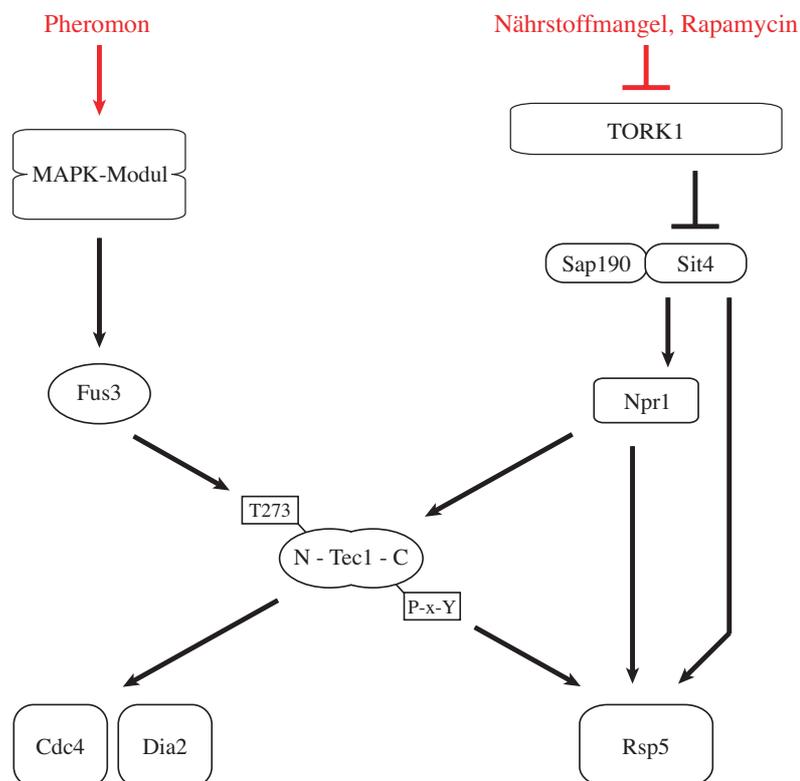


Abb. 44: Vergleich der Pheromon-induzierten und der Nährstoff-abhängigen Regulation von Tec1.

Das dargestellte Modell zeigt die unterschiedlichen Regulationen von Tec1 durch Pheromon und den TOR-Komplex 1. Das Tec1-Protein wurde in N- und C-terminalen Bereich unterschieden und die Regulationsmotive Threonin 273 sowie die P-x-Y-Motive hervorgehoben, um die in den vorangegangenen Abschnitten bereits diskutierten Bereiche für die verschiedenen Regulationsmöglichkeiten kenntlich zu machen. Die eingezeichneten Signalwege sind im Text näher erläutert.

Für die Destabilisierung von Tec1 unter der Wirkung von Pheromon wurde eine posttranslationale Modifikation als Ursache ermittelt: Die Phosphorylierung des Serin 273 von Tec1 durch die aktive MAPK Fus3 führt zu einer Ubiquitinierung des Transkriptionsfaktors und seinem Abbau (Bao *et al.*, 2004; Brückner *et al.*, 2004; Chou *et*

al., 2004). Für die Ubiquitinierung sind die F-Box-Proteine Cdc4 (Chou *et al.*, 2004) oder Dia2 verantwortlich (Bao *et al.*, 2004). Die Pheromon-induzierte Destabilisierung von Tec1 wird hier also durch Markierung des Transkriptionsfaktors in Form einer Phosphorylierung durch eine Proteinkinase und die anschließende Erkennung und Ubiquitinierung durch eine E3-Ubiquitinligase (SCF^{Cdc4} oder SCF^{Dia2}) erreicht. Die Signalkette für den Abbau des Tec1-Proteins unter dem Einfluss von Rapamycin ist dagegen noch nicht vollständig geklärt: Die Destabilisierung erfolgt in Abhängigkeit von einem Phosphatasemodul aus Sit4 und Sap190 sowie der HECT-Ubiquitinligase Rsp5. Ob Tec1 analog zum Pheromon-induzierten Abbau erst mit Hilfe einer Proteinkinase (Npr1) durch Phosphorylierung für eine Interaktion mit der Ubiquitinligase (Rsp5) markiert wird oder ob alternativ dazu eine Regulation der Ubiquitinligase durch die Proteinkinase erfolgt, die dann erst die Erkennung des Substrates (Tec1) ermöglicht, ist bislang unklar. Das Rsp5-Homolog Itch aus *M. musculus* wird beispielsweise durch Phosphorylierung in seine aktive Form gebracht, indem eine intramolekulare, inhibitorische Bindung zwischen den WW-Domänen und der HECT-Domäne verhindert wird (Gallagher *et al.*, 2006).

Obwohl der überwiegende Teil der Ergebnisse in dieser Arbeit die Annahme einer Trennung der Pheromon- und Nährstoff-abhängigen Regulation von Tec1 unterstützt, bleibt ungeklärt, weshalb der Rapamycin-induzierte Abbau von Tec1 in einer *cdc4^{ts}*-Mutante blockiert wird. Vorläufige Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass die für eine Erkennung durch Cdc4 essentiellen Aminosäuren Threonin 273 und Prolin 274 von Tec1 an der Nährstoff-abhängigen Destabilisierung des Transkriptionsfaktors nicht beteiligt sind (Kern, 2006). In Zukunft sollte also die Möglichkeit eines indirekten Einflusses von Cdc4 auf die beteiligten Komponenten der TOR-Komplex 1-abhängigen Signaltransduktion experimentell überprüft werden.

3.3.2. Physiologische Relevanz

Wie könnte der Befund, dass sowohl Pheromon als auch Nährstoffmangel den Abbau des Tec1-Proteins zur Folge haben, erklärt werden? Beide Bedingungen führen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Abb. 45). Da Tec1 ein positiver Regulator des G1-Zyklings *CLN1* ist, erscheint diese Regulation also sinnvoll. Allerdings ist Tec1 ebenfalls ein positiver Regulator des *FLO11*-Gens, dessen Genprodukt für die vegetative Adhäsion benötigt wird und dessen Tec1-vermittelte Aktivierung damit sowohl bei Nährstoffmangel als auch bei der Pheromon-induzierten Konjugation mit einer sexuellen Partnerzelle verloren geht. Bei der Konjugation erscheint eine Hemmung der *FLO11*-Expression sinnvoll, da für die Adhäsion an einer Partnerzelle nicht Flo11, sondern Konjugations-spezifische Agglutinine benötigt werden. Die Expression von dafür benötigten Genen wie *FUS1* und *AGAI* hängt jedoch nicht von Tec1, sondern von dem

Transkriptionsfaktor Ste12 ab. Im Gegensatz dazu hat sich gezeigt, dass es bei Nährstoffmangel zu einer deutlichen Intensivierung der Flo11-abhängigen vegetativen Adhäsion kommt, die, wie man auch erwarten würde, unabhängig von Tec1 zustande kommt (Braus *et al.*, 2003; Cullen und Sprague, 2000).

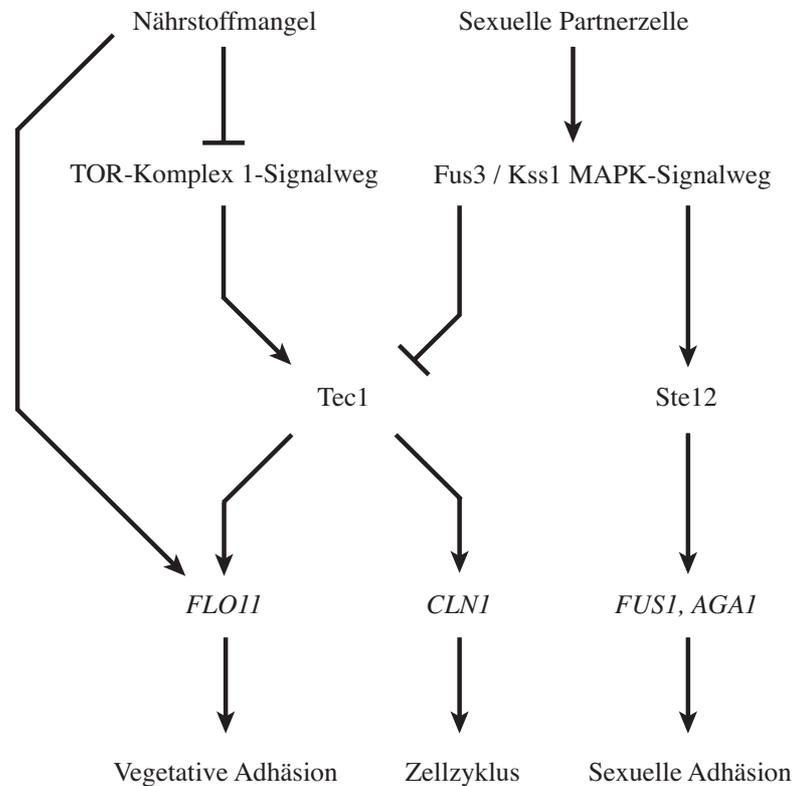


Abb. 45: Vergleich der Tec1-Regulationen durch den Fus3/Kss1 MAPK- und den TOR-Komplex 1-Signalweg.

Abgebildet ist ein Modell der Tec1-abhängigen Regulationen durch die Signalwege des MAPK-Moduls um Fus3/Kss1 und des TOR-Komplexes 1. Beide Signaltransduktionswege beeinflussen den Zellzyklus über das Gen des G1-Zyklins *Cln1* und die zelluläre Adhäsionsfähigkeit über das Gen des Zelloberflächenfokkulins *Flo11*. Während die vegetative Adhäsion von Tec1 abhängig ist, wird die sexuelle Adhäsion durch Agglutine wie *Fus1* und *Aga1* unabhängig von Tec1 erreicht.

Welches System nach der Inaktivierung des TOR-Komplexes 1 genutzt wird, um die *FLO11*-Genexpression in Abwesenheit von Tec1 stabil zu halten, ist jedoch nicht bekannt. Abschließend kann festgestellt werden, dass die Untersuchungen in dieser Arbeit gezeigt haben, dass Tec1 als einziger Vertreter der TEA/ATTS-Transkriptionsfaktorfamilie in *S. cerevisiae* nicht nur wichtige Funktionen bei der Steuerung von Wachstum und Entwicklung übernimmt, sondern auf Proteinebene auch einer komplexen Regulation durch verschiedene äußere Signale und den damit gekoppelten Signalwegen unterliegt. Es wird das Ziel zukünftiger Arbeiten sein, diesen Regulator weiter zu untersuchen, um mehr über diese bislang nur wenig erforschte Familie eukaryotischer Transkriptionsfaktoren zu erfahren.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1. Material

4.1.1. Allgemeine Materialien

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der CARL ROTH GmbH & CO KG oder GE HEALTHCARE bezogen.

Die radioaktiven Substanzen [α - ^{32}P]-dATP, [α - ^{32}P]-dCTP und [γ - ^{32}P]-ATP wurden von der HARTMANN ANALYTIC GmbH geliefert.

Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen stammten von FERMENTAS, NEW ENGLAND BIOLABS, STRATAGENE, FINNZYMES oder PROMEGA. RNaseA wurde von der ROCHE GmbH und Lysozym von GE HEALTHCARE bezogen.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden Kits der Firma QIAGEN verwendet.

DNA-Sequenzierungsreagenzien wurden bei APPLIED BIOSYSTEMS GmbH erworben, Auftragssequenzierungen erfolgten bei SEQUENCE LABORATORIES GmbH.

Die synthetischen Oligonukleotide wurden von INVITROGEN oder METABION hergestellt.

Antikörper wurden von PINEDA ANTIKÖRPERSERVICE und SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. produziert.

Proteingelapparaturen und die Geldokumentationsanlage wurden von BIO-RAD INDUSTRIES GmbH bezogen.

Labor-Verbrauchsmaterialien wurden von SARSTEDT geliefert.

Eine vollständige Liste aller Bezugsquellen und ihrer Standorte findet sich unter Punkt 4.3. dieses Kapitels.

4.1.2. *S. cerevisiae*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind in Tabelle 4 aufgeführt. Sind außer der systematischen Benennung "YHUM" weitere Stammnamen angegeben, so beziehen sich diese auf die angegebene Referenz.

Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YHUM0119	<i>FRE(Ty1)tcs::lacZ::LEU2, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0120	<i>ras2Δ::ura3::HIS3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	(Mösch <i>et al.</i> , 1999)
YHUM0271	<i>ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	(Köhler <i>et al.</i> , 2002)
YHUM0272	<i>ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0389	<i>tpk2Δ::kanR, tpk1Δ::loxP, FRE(Ty1)tcs::lacZ::LEU2, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0397	<i>tpk3Δ::kanR, tpk1Δ::loxP, FRE(Ty1)tcs::lacZ::LEU2, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0407	<i>tpk3Δ::kanR, tpk2Δ::loxP, FRE(Ty1)tcs::lacZ::LEU2, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0451	<i>hog1Δ::TRP1, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0456	<i>ura3Δ0, MATα.</i> Σ 1278b.	Σ 2000, MICROBIA
YHUM0476	<i>ura3Δ0, his3Δ0, leu2Δ0, trp1Δ0, MATα.</i> Σ 1278b.	Σ 2000, MICROBIA
YHUM0482	<i>his3Δ0, leu2Δ0, trp1Δ0, MATα.</i> Σ 1278b	Σ 2000, MICROBIA
YHUM0610 (RH2500)	<i>tec1Δ::HIS3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Köhler <i>et al.</i> , 2002
YHUM0619 (RH2501)	<i>tec1Δ::HIS3, ste12Δ::TRP1, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Köhler <i>et al.</i> , 2002
YHUM0622	<i>ste7Δ::kanR, FRE(Ty1)tcs::lacZ::LEU2, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0677	<i>kss1Δ::hisG, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0678	<i>fus3Δ::TRP1, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0679	<i>kss1Δ::hisG, fus3Δ::TRP1, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0790	<i>TEC(P)::myc³-tec1-201::LEU2, tec1Δ::HIS3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0791	<i>TEC(P)::myc³-tec1-202::LEU2, tec1Δ::HIS3, ura3-52, his3::hisG, leu2::hisG, trp1::hisG, MATα.</i> Σ 1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0792 (RH2955)	<i>tec1Δ::HIS3, ura3-52, MATα.</i> Σ 1278b. <i>BstEII</i> -linearisiertes B1815 und <i>SalI/SmaI</i> -geschnittenes B1814 wurden chromosomal in YHUM0610 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004

Fortsetzung Tabelle 4:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YHUM0793	<i>tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ura3-52, leu2::hisG, his3::hisG, trp1::hisG, MATa. Σ1278b.</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0794 (RH2957)	<i>tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ura3-52, MATa. Σ1278b. BstEII-</i> linearisiertes B1815 wurde chromosomal in YHUM0793 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0795 (RH2958)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ura3-52,</i> <i>MATa. Σ1278b. BstEII-linearisiertes BHUM0773 wurde chromosomal</i> in YHUM0793 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0797 (RH2960)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1^{T273M}::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ura3-52,</i> <i>his3::hisG, trp1::hisG, MATa. Σ1278b. BstEII-linearisiertes</i> BHUM0775 wurde chromosomal in YHUM0793 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0798 (RH2961)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1^{P274S}::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ura3-52,</i> <i>MATa. Σ1278b. BstEII-linearisiertes BHUM0776 wurde chromosomal</i> in YHUM0793 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0799	<i>tec1Δ::HIS3, kss1Δ::kanMX, ura3-52, leu2::hisG, his3::hisG,</i> <i>trp1::hisG, MATa. Σ1278b.</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0800 (RH2963)	<i>tec1Δ::HIS3, kss1Δ::kanMX, ura3-52, MATa. Σ1278b. BstEII-</i> linearisiertes B1815 und <i>SalI/SmaI</i> -geschnittenes B1814 wurden chromosomal in YHUM0799 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0801 (RH2964)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, kss1Δ::kanMX, MATa.</i> Σ1278b. <i>BstEII</i> -linearisiertes BHUM0773 und <i>SalI/SmaI</i> -geschnittenes B1814 wurden chromosomal in YHUM0799 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0803 (RH2966)	<i>myc³-TEC1^{T273M}::LEU2, tec1Δ::HIS3, kss1Δ::kanMX, ura3-52,</i> <i>trp1::hisG, MATa. Σ1278b. BstEII-linearisiertes BHUM0775 wurde</i> chromosomal in YHUM0799 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0804 (RH2967)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1^{P274S}::LEU2, tec1Δ::HIS3, kss1Δ::kanMX, ura3-52,</i> <i>trp1::hisG, MATa. Σ1278b. BstEII-linearisiertes BHUM0776 wurde</i> chromosomal in YHUM0799 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0805	<i>tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, kss1Δ::kanMX, ura3-52, leu2::hisG,</i> <i>his3::hisG, trp1::hisG, MATa. Σ1278b.</i>	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0807 (RH2970)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1,</i> <i>kss1Δ::kanMX, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, MATa. Σ1278b. BstEII-</i> linearisiertes BHUM0773 wurde chromosomal in YHUM0805 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0809 (RH2972)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1^{T273M}::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1,</i> <i>kss1Δ::kanMX, ura3-52, MATa. Σ1278b. BstEII-linearisiertes</i> BHUM0775 wurde chromosomal in YHUM0805 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0810 (RH2973)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1^{P274S}::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1,</i> <i>kss1Δ::kanMX, ura3-52, MATa. Σ1278b. BstEII-linearisiertes</i> BHUM0776 wurde chromosomal in YHUM0805 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0811 (RH3160)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, ste7Δ::kanMX, ura3-52,</i> <i>MATa. Σ1278b. Das ApaI/BamHI geschnittene ste7Δ::kanMX-Fragment</i> aus BHUM0236 wurde chromosomal in YHUM0788 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004

Fortsetzung Tabelle 4:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YHUM0812 (RH3161)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ste7Δ::kanMX, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. Das <i>ApaI/BamHI</i> -geschnittene <i>ste7Δ::kanMX</i> -Fragment aus BHUM0236 wurde chromosomal in YHUM0795 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0813 (RH3162)	<i>URA3(P)-myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. <i>BstEII</i> -linearisiertes BHUM0781 und <i>SalI/SmaI</i> -geschnittenes B1814 wurden chromosomal in YHUM0610 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0814 (RH3163)	<i>URA3(P)-myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. <i>BstEII</i> -linearisiertes BHUM0781 wurden chromosomal in YHUM0793 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0815 (RH3164)	<i>URA3(P) myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, kss1Δ::kanMX, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. <i>BstEII</i> -linearisiertes BHUM0781 und <i>SalI/SmaI</i> -geschnittenes B1814 wurden chromosomal in YHUM0799 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0816 (RH3165)	<i>URA3(P) myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, kss1Δ::kanMX, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. <i>BstEII</i> -linearisiertes BHUM0781 wurde chromosomal in YHUM0805 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0817 (RH3166)	<i>URA3(P) myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, ste7Δ::kanMX, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. Das <i>ApaI/BamHI</i> -geschnittene <i>ste7Δ::kanMX</i> -Fragment aus BHUM0236 wurde chromosomal in YHUM0813 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0818 (RH3167)	<i>URA3(P) myc³-TEC1::LEU2, tec1Δ::HIS3, fus3Δ::TRP1, ste7Δ::kanMX, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. Das <i>ApaI/BamHI</i> -geschnittene <i>ste7Δ::kanMX</i> -Fragment aus BHUM0236 wurde chromosomal in YHUM0814 integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0819 (RH3168)	<i>TEC(P)::myc³-TEC1^{T273M}::LEU2, tec1Δ::HIS3, ura3-52, MATa</i> . Σ1278b. <i>Bst1107I/SalI</i> -verdautes B1814 wurde chromosomal in YHUM0790 integriert. <i>TEC(P)::myc³-TEC1^{T273M}</i> wurde durch Transformation mit <i>BstEII</i> -linearisiertem BHUM0775 chromosomal integriert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
YHUM0903 (Y26124)	<i>rsp5Δ::kanMX4/RSP5, ura3Δ0/ura3Δ0, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0, lys2Δ0/LYS2, MET15/met15Δ0, MATa/α</i> . BY4743.	EUROSCARF
YHUM0910	<i>ura3-52, trp1::hisG, MATa</i> . Σ1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0911	<i>gcn2Δ::LEU2, ura3-52, leu2::hisG, trp1::hisG, MATa</i> . Σ1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0913	<i>gcn4Δ::LEU2, ura3-52, leu2::hisG, trp1::hisG, MATa</i> . Σ1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0915	<i>gcn2Δ::kanR, gcn4Δ::LEU2, ura3-52, leu2::hisG, trp1::hisG, MATa</i> . Σ1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM0971 (Y00000)	<i>ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1048	<i>tec1Δ::HIS3, TRP1, ura3-52, leu2::hisG, MATa</i> . Σ1278b. Chromosomale Integration von <i>SnaI</i> -linearisiertem pRS304 in YHUM0610.	Diese Arbeit

Fortsetzung Tabelle 4:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YHUM1085	<i>bul1Δ::URA3, ura3Δ0, his3Δ0, leu2Δ0, trp1Δ0, MATa</i> . Σ1278b. Die <i>bul1Δ::URA3</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer SB-BUL1-1 und SB-BUL1-2 aus BHUM0969 amplifiziert und chromosomal in YHUM0476 integriert. Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus SB-BUL1-3 und SB-BUL1-4.	Diese Arbeit
YHUM1087	<i>bul2Δ::URA3, ura3Δ0, his3Δ0, leu2Δ0, trp1Δ0, MATa</i> . Σ1278b. Die <i>bul2Δ::URA3</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer SB-BUL2-1 und SB-BUL2-2 aus BHUM0969 amplifiziert und chromosomal in YHUM0476 integriert. Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus SB-BUL2-3 und SB-BUL2-4.	Diese Arbeit
YHUM1089	<i>npr1Δ::URA3, ura3Δ0, his3Δ0, leu2Δ0, trp1Δ0, MATa</i> . Σ1278b. Die <i>npr1Δ::URA3</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer SB-NPR1-1 und SB-NPR1-2 aus BHUM0969 amplifiziert und chromosomal in YHUM0476 integriert. Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus SB-NPR1-3 und SB-NPR1-4.	Diese Arbeit
YHUM1093	<i>bul1Δ::kanMX4, bul2Δ::URA3, ura3Δ0, his3Δ0, leu2Δ0, trp1Δ0, MATa</i> . Σ1278b. Die <i>bul1Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer SB-BUL1-1 und SB-BUL1-2 aus BHUM0966 amplifiziert und chromosomal in YHUM1087 integriert. Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus SB-BUL1-3 und SB-BUL1-4.	Diese Arbeit
YHUM1104	<i>URA3(P)::OLE1::LEU2, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, MATa</i> . Σ1278b. Chromosomale Integration von <i>EcoRV</i> -linearisiertem BHUM1053 in YHUM0271.	Diese Arbeit
YHUM1112 (Y02713)	<i>apc9Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1113 (05336)	<i>asi3Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1114 (Y05850)	<i>cdc26Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1115 (Y04371)	<i>cdh1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1116 (Y04633)	<i>cul3Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1117 (Y04085)	<i>dcn1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1118 (Y06902)	<i>grr1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1119 (Y01704)	<i>hrd1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1120 (Y04156)	<i>hrd3Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1121 (Y02708)	<i>hrt3Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1122 (Y06834)	<i>hul4Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF

Fortsetzung Tabelle 4:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YHUM1124 (Y05277)	<i>mdm30Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1125 (Y03578)	<i>mfb1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1126 (Y03672)	<i>pib1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1127 (Y00597)	<i>qri8Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1128 (Y05701)	<i>rog3Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1129 (Y02394)	<i>rup1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1130 (Y03619)	<i>swm1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1131 (Y03914)	<i>rri1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1133 (Y04392)	<i>ygl024wΔ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1134 (Y01376)	<i>rtt101Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1135 (Y04077)	<i>san1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1136 (Y01133)	<i>skp2Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1137 (Y07299)	<i>ssm4Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1138 (Y04291)	<i>tom1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1139 (Y04883)	<i>tul1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1140 (Y04814)	<i>ubr1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1141 (Y01579)	<i>ubr2Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1142 (Y04859)	<i>ufd4Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1143 (Y00482)	<i>ufo1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1144 (Y01276)	<i>yil149wΔ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1145 (Y04065)	<i>ydr131cΔ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF
YHUM1146 (Y03665)	<i>ydr306cΔ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa.</i> BY4741.	EUROSCARF

Fortsetzung Tabelle 4:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YHUM1148 (Y01856)	<i>dia2Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1149 (Y01400)	<i>urm1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1150 (Y01939)	<i>uba4Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1152 (Y04245)	<i>siz1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1153 (Y02412)	<i>siz2Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1155 (Y02779)	<i>dig1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1156 (Y04314)	<i>dig2Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1157 (Y07006)	<i>yak1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1158 (Y02015)	<i>whi3Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1159 (Y13771)	<i>bre1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0, MATα</i> . BY4742.	EUROSCARF
YHUM1160 (Y07122)	<i>asi1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1161 (Y03305)	<i>ubs1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1179	<i>ura3, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ade2-1, can1-100, MATa</i> . W303.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1180	<i>cdc4 (ts), ura3, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ade2-1, can1-100, MATa</i> . W303.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1195	<i>ure2Δ::kanR,, ura3-52, trp1::hisG, MATa</i> . Σ1278b.	Stammsammlung AG Mösch
YHUM1341	<i>rsp5Δ::kanMX4, URA3(P)::OLE1::LEU2, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, MATa</i> . Σ1278b. Die <i>rsp5Δ::kanMX4</i> -Deletionskassette wurde mit Hilfe der Primer SB-RSP5-3 und SB-RSP5-4 aus YHUM0903 amplifiziert und chromosomal in YHUM1104 integriert. Überprüft durch eine Southern-Hybridisierung mit einer Sonde aus SB-RSP5-3 und SB-RSP5-5.	Diese Arbeit
YHUM1349 (Y00993)	<i>mpk1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1355 (IP31)	<i>rim15::kanMX2, ura3-52, his3, leu2, trp1, MATα</i> . KT1960.	Pedruzzi <i>et al.</i> , 2003
YHUM1356 (KT1960)	<i>ura3-52, his3, leu2, trp1, MATα</i> . KT1960.	Pedruzzi <i>et al.</i> , 2003
YHUM1358	<i>ura3, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ade2-1, can1-100, MATa</i> . W303-1A.	Thomas und Rothstein, 1989

Fortsetzung Tabelle 4:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
YHUM1383 (Y04010)	<i>pph3Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1384 (Y02312)	<i>rrd1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1385 (Y02100)	<i>rrd2Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1389 (Y07045)	<i>sap190Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1390 (Y05459)	<i>tip41Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF
YHUM1391 (Y05473)	<i>smk1Δ::kanMX4, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, MATa</i> . BY4741.	EUROSCARF

4.1.3. *E. coli*-Stämme und Plasmide

Verwendete *E. coli*-Stämme: Für Klonierungen wurden die *E. coli*-Stämme DH5α [F^- , $\phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsd17*, (r_K^- , m_K^+), *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*] (Hanahan, 1983) und SURE[®] [*e14* (*McrA*⁻), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)117$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, *recB*, *recJ*, *sbcC*, *umuC::Tn5*, (*Kan^r*), *uvrC*, [F' *proAB lacI^qZAM15Tn10* (*Tet^r*)] (STRATAGENE) verwendet.

Die heterologe Expression von *MBP-TEC1-FLAG* und *TEC1¹⁻²⁸⁰* erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-Star-pLysS [F^- , *ompT*, *hsdS_B* (r_B^- m_B^-), *gal*, *dcm*, *lon*, *rne131* (DE3), *pLysS* (*Cam^R*)] (INVITROGEN).

Verwendete Plasmide: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 5 aufgeführt. Sind außer der systematischen Benennung "BHUM" oder "B" weitere Bezeichnungen angegeben, so beziehen sich diese auf die angegebene Referenz.

Tabelle 5: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Referenz
B1814 (pRS304)	<i>TRP1</i> , <i>AMP^R</i>	Sikorski und Hieter, 1989
B1815 (pRS305)	<i>LEU2</i> , <i>AMP^R</i>	Sikorski und Hieter, 1989
B2025	pBluescript II KS ⁺ , <i>AMP^R</i>	STRATAGENE
B2440 (YEplac181)	<i>LEU2</i> , $2\mu m$, <i>AMP^R</i>	Gietz und Sugino, 1988

Fortsetzung Tabelle 5:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
B3111 (pYGEX-2T)	<i>URA3, GAL1(P)::GST, 2μm, AMP^R</i>	Schlenstedt <i>et al.</i> , 1995
B3744	<i>KSSI^{K42R}-HA3, TRP1, CEN, AMP^R</i>	Madhani <i>et al.</i> , 1997
BHUM0029	<i>GAL1(P)::TEC1, URA3, CEN, AMP^R</i>	Stammsammlung AG Mösch
BHUM0236	<i>ste7Δ::kanMX</i> in B2025	Stammsammlung AG Mösch
BHUM0267 (pME2065)	<i>TEC1(P)::lacZ, URA3, 2μm, AMP^R</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0388 (B3513)	<i>MBP-TEC1-FLAG</i> -Fusion in pMAL-c2	Madhani und Fink, 1997
BHUM0390 B3672)	<i>MBP-FLAG</i> -Fusion in pMAL-c2	Madhani und Fink, 1997
BHUM0443 (GA1905)	<i>TPH1(P)-FUS3^{K42R}-MYC</i>	Gartner <i>et al.</i> , 1992
BHUM0687 (pME2279)	<i>myc³-TEC1</i> in YCplac33	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0688 (pME2280)	<i>TEC1(P)-myc³-TEC1, URA3, 2μm, AMP^R</i>	Stammsammlung AG Mösch
BHUM0689 (pME2281)	<i>TEC1(P):: myc³-tec1-102, URA3, 2μm, AMP^R</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0693 (pME2285)	<i>TEC1(P):: myc³-tec1-202, URA3, 2μm, AMP^R</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0695 (pME2287)	<i>TEC1(P):: myc³-tec1-201, URA3, 2μm, AMP^R</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0703 (pME2295)	<i>TEC1(P):: myc⁶-TEC1, URA3, CEN, AMP^R</i>	Köhler <i>et al.</i> , 2002
BHUM0755 (pME2435)	<i>GALI-GST-KSSI</i> in B3111: <i>KSSI</i> wurde als <i>BamHI</i> -Fragment mit den Primern SB-KSS1-1 und SB-KSS1-2 amplifiziert und in B3111 ligiert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0756 (pME2436)	<i>GALI-GST-FUS3</i> in B3111: <i>FUS3</i> wurde als <i>BamHI</i> -Fragment mit den Primern SB-FUS3-1 und SB-FUS3-2 amplifiziert und in B3111 ligiert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0759 (pME2439)	<i>TEC1(P)::myc⁶-TEC1, LEU2, 2μm, AMP^R</i>	Stammsammlung AG Mösch
BHUM0760 (pME2440)	<i>myc³-TEC1¹⁻²⁸⁰</i> in YEplac181: Ligation eines 3,2kb <i>myc³-TEC1¹⁻²⁸⁰</i> <i>PstI/SmaI</i> -Fragmentes von pME2281 in YEplac181.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0765	<i>RSP5</i> in B3111: <i>RSP5</i> wurde als <i>Sall</i> -Fragment mit den Primern SB-RSP5-1 und SB-RSP5-2 amplifiziert und in B3111 ligiert.	Diese Arbeit
BHUM0767 (pME2508)	<i>GALI-GST-KSSI^{K42R}</i> in B3111: <i>KSSI^{K42R}</i> wurde als <i>BamHI</i> -Fragment mit den Primern SB-KSS1-1 und SB-KSS1-2 von B3744 amplifiziert und in B3111 ligiert.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0768 (pME2509)	<i>myc³-TEC1</i> in YEplac181: Ligation eines 3,2kb <i>myc³-TEC1</i> <i>PstI/SmaI</i> -Fragmentes von pME2280 in YEplac181.	Brückner <i>et al.</i> , 2004

Fortsetzung Tabelle 5:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
BHUM0773 (pME2514)	<i>myc³-TEC1</i> in YIplac128: Ligation eines 3,2kb <i>myc³-TEC1</i> <i>PstI/SmaI</i> -Fragmentes von pME2280 in YEplac128.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0775 (pME2516)	<i>myc³-TEC1^{T273M}</i> in YIplac128: Insertion des 2,1kb <i>myc³-TEC1^{T273M}</i> <i>SalI/BamHI</i> -Fragmentes von pME2287 in BHUM0773.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0776 (pME2517)	<i>myc³-TEC1^{P274S}</i> in YIplac128: Insertion des 2,1kb <i>myc³-TEC1^{P274S}</i> <i>SalI/BamHI</i> -Fragmentes von pME2285 in BHUM0773.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0780 (pME2676)	<i>GST-TEC1^{I-280}</i> in pETM30: Amplifikation von <i>TEC1^{I-280}</i> durch die Primer SB-TEC1-5 und TK-TEC1-5, Restriktion mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> und Ligation in BHUM1157.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0781 (pME2678)	<i>URA3(P)-myc³-TEC1</i> in pRS305: Restriktion von BHUM0703 durch <i>BamHI</i> und anschließende Insertion des 2,2kb <i>myc³-TEC1</i> -Fragmentes in BHUM1158.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM0969 (pUG72)	<i>Kluyveromyces lactis URA3(P)::URA3::URA3(T), AMP^R</i>	Güldener <i>et al.</i> , 2002
BHUM1053	<i>URA3(P)::OLE1</i> : Amplifikation von <i>OLE1</i> mit den Primern SB-OLE1-1 und SB-OLE1-2 sowie anschließende Restriktion mit <i>BamHI/XbaI</i> . Ligation in <i>BamHI/XbaI</i> -geschnittenen BHUM1158.	Diese Arbeit
BHUM1153 (pME2690)	<i>TEC1(P)::myc³-TEC1^{S86A}</i> in YCplac33: Amplifikation von <i>TEC1^{S86A}</i> aus BHUM1165 durch die Primer SB-TEC1-10 und SB-TEC1-11 und anschließende Ligation. Restriktion der Parental-DNA durch <i>DpnI</i> und Transformation in <i>E. coli</i> Dh5 α (Zwischenprodukt BHUM1166). Rückklonierung des 2,1kb <i>TEC1^{S86A}</i> <i>SalI/BamHI</i> -Fragmentes in BHUM1167.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM1154 (pME2691)	<i>TEC1(P)::myc³-TEC1^{T252A}</i> in YCplac33: Amplifikation von <i>TEC1^{T252A}</i> aus BHUM1165 durch die Primer SB-TEC1-24 und SB-TEC1-25 und anschließende Ligation. Restriktion der Parental-DNA durch <i>DpnI</i> und Transformation in <i>E. coli</i> Dh5 α (Zwischenprodukt BHUM1168). Rückklonierung des 2,1kb <i>TEC1^{T252A}</i> <i>SalI/BamHI</i> -Fragmentes in BHUM1167.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM1155 (pME2692)	<i>TEC1(P)::myc³-TEC1^{T273A}</i> in YCplac33: Amplifikation von <i>TEC1^{T273A}</i> aus BHUM1165 durch die Primer SB-TEC1-12 und SB-TEC1-13 und anschließende Ligation. Restriktion der Parental-DNA durch <i>DpnI</i> und Transformation in <i>E. coli</i> Dh5 α (Zwischenprodukt BHUM1169). Rückklonierung des 2,1kb <i>TEC1^{T273A}</i> <i>SalI/BamHI</i> -Fragmentes in BHUM1167.	Brückner <i>et al.</i> , 2004
BHUM1157 (pETM-30)	<i>HIS-GST-(TEV-site)</i> , Kanamycin	G. Stier, EMBL, Heidelberg
BHUM1165 (pTK248)	<i>TEC1</i> in B2025, <i>AMP^R</i>	Stammsammlung AG Mösch
BHUM1166 (pTK249)	<i>TEC1^{S86A}</i> in B2025, <i>AMP^R</i>	Stammsammlung AG Mösch
BHUM1167 (pTK150)	<i>TEC1(P)::myc³-TEC1</i> in B2445	Stammsammlung AG Mösch
BHUM1168 (pTK251)	<i>TEC1^{T252A}</i> in B2025, <i>AMP^R</i>	Stammsammlung AG Mösch

Fortsetzung Tabelle 5:

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Referenz
BHUM1169 (pTK253)	<i>TEC1</i> ^{T273A} in B2025, <i>AMP</i> ^R	Stammsammlung AG Mösch

4.1.4. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Rubrik "Verwendung" verweist jeweils auf die *S. cerevisiae*-Stämme oder Plasmide, für deren Herstellung die Oligonukleotide genutzt wurden.

Tabelle 6: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Primer	Verwendung	Sequenz 5'-3'
ACT-OL1	<i>ACT1</i> -Sonde	GCT GCT TTG GTT ATT GAT AAC GG
ACT-OL1	<i>ACT1</i> -Sonde	CAC TTG TGG TGA ACG ATA GAT GG
FLO11-3	<i>FLO11</i> -Sonde	CCA ACC ACC TAT GTA ACC AC
FLO11-4	<i>FLO11</i> -Sonde	CTG GAA GAG CGA GTA GCA ACC
SB-BUL1-1	YHUM1085, YHUM1093	AGG GCG AAA AGA GAC TGT TCG TGT GTG TCA ACA GGT ATA TCG TAC GCT AAC AGC TGA AGC TTC GTA CGC
SB-BUL1-2	YHUM1085, YHUM1093	ATA TAT CTA TAT CTA TAA GAA AAG TAA CGA GAA TTT TTT CTA ATG TTT TTG CAT AGG CCA CTA GTG GAT CTG
SB-BUL1-3	YHUM1085, YHUM1093	GGT TGT GAC TTG ACC AGA TGG
SB-BUL1-4	YHUM1085, YHUM1093	CGA ACA GTC TCT TTT CGC
SB-BUL2-1	YHUM1087	AAC TGA AGC AGC AGA TTT GAG ATA TAT TCT GGG GAA CAA AAG AAG TAT TAC AGC TGA AGC TTC GTA CGC
SB-BUL2-2	YHUM1087	TTT TAT CAA TTA TTT GTA AAA CTG CGA GAT TAC TGT TAG TGT TGT ATG GTG CAT AGG CCA CTA GTG GAT CTG
SB-BUL2-3	YHUM1087	CTG AGC AGA GGA AGA GCA TTC
SB-BUL2-4	YHUM1087	CTC AAA TCT GCT GCT TCA
SB-CLN1-1	<i>CLN1</i> -Sonde	CAC TCA GAA GTG AAA ACT GGG
SB-CLN1-2	<i>CLN1</i> -Sonde	GGC ACG TTG TGG TAT TTC AG
SB-FUS3-1	BHUM0756, BHUM0766	CGC GGA TCC ATG CCA AAG AGA ATT GTA TAC
SB-FUS3-2	BHUM0756, BHUM0766	CGC GGA TCC CTA ACT AAA TAT TTC GTT CC

Fortsetzung Tabelle 6

Primer	Verwendung	Sequenz 5'-3'
SB-KSS1-2	BHUM0755, BHUM0767	CGC GGA TCC CTA TTC CAT GGT CTT CAT TAG
SB-loxP-back	YHUM1376	CGT ATA GCA TAC ATT ATA CG
SB-NPR1-1	YHUM1089	CCA ACA GCT CAT ACC CAT TCA AAC AAA AAA GGA AAG CTC TAC GAA ACA TTC AGC TGA AGC TTC GTA CGC
SB-NPR1-2	YHUM1089	AAA GGT TAT ATA CAA ATG CTT GGA AAA GAA ATA AAA GTG GGG ACG CTT ATG CAT AGG CCA CTA GTG GAT CTG
SB-NPR1-3	YHUM1089	GAT GCT TGA CAA GCA ATA AAC
SB-NPR1-4	YHUM1089	GAA TGG GTA TGA GCT GTT GG
SB-OLE1-1	BHUM1053	GCG GGA TCC ATG CCA ACT TCT GGA ACT ACT A
SB-OLE1-2	BHUM1053	GCG TCT AGA TTA AAA GAA CTT ACC AGT TTC G
SB-RSP5-1	BHUM0765	CGC GCG TCG ACA TGC CTT CAT CCA TAT CCG TC
SB-RSP5-2	BHUM0765	CGC GCG TCG ACT CAT TCT TGA CCA AAC CCT ATG
SB-RSP5-3	YHUM1341	GGG GGA GGG GGC TTC TAT CTC GAC
SB-RSP5-4	YHUM1341	GTG TAG GTG ACT GGC AAG AGA GGG
SB-RSP5-5	YHUM1341	GGG AAT AAG AAA AGG GGA AAA TAG
SB-SIT4-2	YHUM1376	GTG GAG ATT CGC CGT TAA TTG G
SB-SIT4-3	YHUM1376	GGA AGG CCA CGC TAT TGG TAA C
SB-SIT4- KO1	YHUM1376	CAT ACT ATC ATA AGC ATA CAG ATA AAG GAG TTC TGC ACA TAC GGT CCC TCT TTC TCT TCC CAG CTG AAG CTT CGT ACG
SB-SIT4- KO2	YHUM1376	GCT CTT AGA ATG TGC TTG TTG TGT ATC GTA TCG TAG CAA ATG GCG TAA TGA AAA AGG CAT AGG CCA CTA GTG GAT CTG
SB-TEC1-1	TEC1-Sonde	GCG GAA TTC ATG GTC GAC AGT CTT AAA GAA
SB-TEC1-2	TEC1-Sonde	GCG GGA TCC TTA ATA AAA GTT CCC ATG CGA TTG
SB-TEC1-5	BHUM0780	GCG GGA TCC TTA CTC GTT GGA AGC AGT GAT TGG
SB-TEC1-10	BHUM1153	TCG GAC GAT TTG AAA GCT CCA TCA AGC AAA GGC TA
SB-TEC1-11	BHUM1153	TAG CCT TTG CTG ATG GAG CTT TCA AAT CGT CCG A
SB-TEC1-12	BHUM1155	ACA TTC AAA ACT GCT TGC GCC AAT CAC TGC TTC C
SB-TEC1-13	BHUM1155	GGA AGC AGT GAT TGG CGC AAG CAG TTT TGA ATG T
SB-TEC1-24	BHUM1154	CAG TGA TTC TGG AAG TTT AGC CCC TAA AAA CCT CTA TGT A
SB-TEC1-25	BHUM1154	TAC ATA GAG GTT TTT AGG GGC TAA ACT TCC AGA ATC ACT G
TK-TEC1-5	BHUM0780	GGT GGT CCA TGG GAA GTC TTA AAG AAG ACG ACT TTG GC
TK-TEC1-6	BHUM0769	CGC GGA TCC GGC CCC GAC TTG AAT GAT TTT CAA GGT AGG
TK-TEC1-9	BHUM0769	CGC GGA TCC AAA AAA ATT GAA AAT TTC ATA AAA ACT AAT GC

4.2. Methoden

4.2.1. Kultivierung der Mikroorganismen

4.2.1.1. Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden in Luria-Bertani-Vollmedium (LB) (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl) bei 37°C auf einem Rotationsschüttler kultiviert. Für Selektivmedien wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml, Kanamycin in einer Endkonzentration von 30 µg/ml oder Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 20 µg/ml zugegeben. Das Festmedium enthielt 2% (w/v) Agar.

SOB- und SOC-Medium für die Präparation und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurden nach Inoue *et al.* (1990) hergestellt.

Das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 595 nm gegen das verwendete Medium verfolgt. Dabei entspricht eine $OD_{595nm} = 1$ einer Zelldichte von $2 \cdot 10^8$ Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986). Wachstumszeiten und Volumina zum Animpfen ergaben sich aus:

$$v_i = \frac{v_c \cdot OD_t}{OD_p} \cdot e^{\mu \Delta t}$$

v_i = Impfvolumen (ml)

OD_p = OD der Primärkultur

v_c = Volumen der Kultur (ml)

μ = Wachstumsrate (Std.⁻¹)

OD_t = gewünschte OD nach der Zeit t

Δt = Wachstumszeit (Std.)

4.2.1.2. Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde in YEPD (2% (w/v) Pepton, 1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Glukose) oder zur Selektion auf dem synthetischen Komplexmedium SC (0,15% (w/v) Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren und ohne $(NH_4)_2SO_4$), 0,5% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 mM *myo*-Inositol, 0,2% (w/v) Aminosäure-Mix (2 g jeder Standard-L-Aminosäure, außer L-Histidin, L-Leucin, L-Tryptophan, zuzüglich 0,2 g p-Aminobenzoat)) bei 30°C auf einem Dreh- oder Rotationsschüttler kultiviert. Wärmeempfindliche Mutanten wurden bei 25°C inkubiert. Als Kohlenstoff-Quelle wurde dem SC-Medium 2% (w/v) Glukose oder 2% (w/v) Galaktose / 1% (w/v) Raffinose für die Induktion des *GALI*-Promotors zugesetzt. Die Supplemente wurden nach den Anforderungen des verwendeten Hefestammes entsprechend Sherman *et al.* (1986) zugesetzt. Feste Medien enthielten 2% (w/v) Agar. Geneticin-G418 (INVITROGEN) wurde in einer Endkonzentration von 200 µg/ml verwendet. Für die Pheromon-Induktion in Flüssigmedien wurden exponentiell wachsende Kulturen eine Stunde mit 0,5 - 1,0 µM synthetischem α -Faktor (NOVABIOCHEM)

behandelt. Rapamycin (LC-LABORATORIES) wurde, soweit nicht anders angegeben, in einer Endkonzentration von 200 ng/ml eingesetzt.

Das Wachstum der Hefezellen wurde durch Messung der OD_{595nm} verfolgt. Hierbei entspricht OD_{595nm} = 1 einer Zelldichte von ca. $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml (Sherman *et al.*, 1986).

4.2.2. DNA-Präparation

4.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*: "STET Prep" (Holmes und Quigley, 1981)

1.5 ml einer Übernacht-Kultur wurden in einer Laborzentrifuge für 1 Minute bei 13000 ×g pelletiert und in 400 µl STET-Puffer (8% (w/v) Saccharose, 0,5% (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert. Nach Zusatz von 25 µl Lysozym (12 mg/ml) wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen 40 Sekunden in kochendem Wasser aufgeschlossen und die Zelltrümmer mit 13000 ×g bei 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Der klebrige Niederschlag wurde mit einem sterilen Zahnstocher aus dem Reaktionsgefäß entfernt, die Plasmid-DNA durch Zugabe von 50 µl 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) und 500 µl Isopropanol gefällt und für 10 Minuten mit 13000 ×g bei 4°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%-igem EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) aufgenommen. Soweit erforderlich wurde die Plasmid-DNA bei -20°C aufbewahrt.

4.2.2.2. QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN)

Für Klonierungszwecke wurde Plasmid-DNA mit dem "QIAprep® Spin Miniprep"-System (QIAGEN) gewonnen. Die Anzucht der gewünschten *E. coli*-Klone erfolgte über Nacht bei 37°C in 5 ml Selektivmedium auf einem Rotationsschüttler. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers, die Elution mit 50 µl dH₂O. Die Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt. Für Sequenzierungen wurde die DNA mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat und 2,5 Volumen 96%-igem EtOH erneut gefällt. Nach 15 Minuten Zentrifugation mit 13000 ×g bei 4°C wurde das Präzipitat mit 70%-igem EtOH gewaschen und getrocknet. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte in 50 µl "HiPerSolv Chromanorm H₂O" (VWR).

4.2.2.3. Isolierung der Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*: "Smash & Grab" (Hoffman und Winston, 1987)

10 ml Hefekulturen wurden in Selektionsmedium über Nacht bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, mit 500 µl H₂O gewaschen und anschließend

in 200 µl Lysierungspuffer (2% (w/v) Triton X-100, 1% (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) und 200 µl einer TE-gesättigten Roti®-Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol-Lösung (Verhältnis 25 : 24 : 1) (CARL ROTH) wurden die Zellen durch 5-minütiges Schütteln (IKA® "Vibrax Basic") aufgebrochen. Dieser Schritt wurde nach 5 Minuten Zentrifugation bei 13000 ×g mit dem Überstand wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA im Überstand durch Zugabe von 1 ml EtOH gefällt, abzentrifugiert und in 400 µl TE mit 3 µl RNaseA (10 mg/ml) für mindestens 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Fällung durch 1 ml EtOH und 10 µl 4 M Ammoniumacetat wurde die DNA abzentrifugiert, getrocknet und in 50 µl TE gelöst. Die DNA wurde in dieser Form für Southern-Hybridisierungen und als PCR-Matrize eingesetzt.

4.2.2.4. Isolierung von Plasmiden aus *S. cerevisiae* zur Retransformation (Robzyk und Kassir, 1992)

Die Zellen von 1,5 ml Übernachtskultur wurden in 100 µl Puffer S (8% (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 5% (w/v) Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 200 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) durch 5-minütiges Schütteln (IKA® "Vibrax Basic") aufgebrochen. Nach Zugabe von weiteren 100 µl Puffer S wurde der Extrakt 3 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend bei 4°C 10 Minuten bei 13000 ×g abzentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden mit 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat gemischt, 1 Std. bei -20°C gekühlt und erneut zentrifugiert. Danach wurden 100 µl des Überstands mit 200 µl eiskaltem EtOH gemischt, die DNA durch 10 Minuten Zentrifugation bei 4°C und 13000 ×g pelletiert und in 20 µl H₂O resuspendiert. 10 µl dieser Lösung wurden für *E. coli*-Transformationen nach der "SOC-Methode" (siehe 4.2.4.1.) eingesetzt.

4.2.3. Klonierungstechniken

4.2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion "PCR" (modifiziert nach Saiki *et al.* 1985)

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit den thermostabilen Enzymen "Taq-Polymerase" (FERMENTAS), "KOD-Hifi-DNA-Polymerase" (NOVAGEN) oder "Phusion" (FINNZYMES) durchgeführt. Üblicherweise wurden 5-50 pmol Oligonukleotid und 10-100 ng DNA als Matrize in 20-50 µl Reaktionspuffer entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Art und Dauer des Temperaturprofils richteten sich ebenfalls nach den Angaben der Hersteller, der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotiden und der Komplexität der Matrize.

4.2.3.2. Restriktion von DNA

Für analytische Restriktionen wurden ca. 0.5 µg DNA mit 1-2 Units Restriktionsenzym (FERMENTAS, NEW ENGLAND BIOLABS) in einem Volumen von 20 µl nach Angabe des Herstellers 2 Std. inkubiert. Für die Restriktion präparativer Mengen DNA wurden größere Volumina und Enzymmengen eingesetzt. Reaktionspuffer wurden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden wahlweise zusammen oder sequenziell durchgeführt. Gegebenenfalls wurden Restriktionsansätze über eine "QIAquick® Mini Column" des "QIAquick® Gel Extraction Kit" (QIAGEN) gereinigt.

4.2.3.3. Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Um die Religation von linearisierten Plasmiden zu verhindern, wurde die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Dazu wurden die alkalischen Phosphatasen "Calf Intestine Phosphatase" (NEW ENGLAND BIOLABS) oder "Shrimp Alkaline Phosphatase" (FERMENTAS) nach den Angaben des jeweiligen Herstellers benutzt.

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte durch T4-DNA-Ligase (FERMENTAS) nach Angaben des Herstellers. Die Reaktionsdauer betrug bei Ligation adhäsiver DNA-Enden 1 Std. bei Raumtemperatur, ansonsten 8 Std. bei 16°C. Die Konzentration der DNA betrug 1 - 10 µg/ml, das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA wurde zwischen 1:5 und 1:10 variiert. Die Ligationsreaktion wurde durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C abgestoppt und die DNA ohne weitere Reinigung zur Transformation eingesetzt (modifiziert nach Maniatis *et al.*, 1982).

4.2.3.4. Agarose-Gelelektrophorese

Zur DNA-Lösung wurden 0,1 Volumen DNA-Probenpuffer (25% (w/v) Ficoll 4000, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol, 200 mM EDTA pH 8,0) gegeben und die DNA-Fragmente in einem horizontalen Agarosegel in TAE-Puffer (20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, 40 mM Tris-Acetat pH 8,3) in Gegenwart von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei 80-100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose richtete sich dabei nach der Länge der zu untersuchenden DNA. Sie betrug üblicherweise 1% (w/v). DNA-Banden, die für die Isolierung vorgesehen waren, wurden mittels eines UV-Transilluminators bei $\lambda = 366$ nm detektiert. Ansonsten erfolgte die Dokumentation durch eine Gel-Doc-XR (BIO-RAD INDUSTRIES GmbH).

4.2.3.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose

Die DNA-Bande wurde unter UV-Licht niedriger Energie ($\lambda = 366$ nm) ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurden die Säulen und Puffer des

Gelextraktionssystems "QIAquick® Gel Extraction Kit" (QIAGEN) gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet. Zur Elution der DNA wurden 50 µl dH₂O oder EB-Puffer (QIAGEN) verwendet. Die gelöste DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

4.2.3.6. Sequenzspezifische Mutagenese

Für die Einführung von Punktmutationen in *TECI* wurden Primer mit der gewünschten Mutation synthetisiert und Wildtyp-*TECI* in BHUM1165 als "Template" genutzt. Bei den 15 Zyklen der nachfolgenden PCR wurde das Plasmid vollständig amplifiziert. Nach einer Ligation wurde die methylierte Template-DNA (ohne Mutation) durch eine *DpnI*-Restriktion geschnitten. Übrig blieb das Amplifikat: In B2025 integriertes *TECI** mit der gewünschten Punktmutation. Nach Transformation in *E. coli* konnte das gewonnene Plasmid reisoliert und sequenziert werden. Bei erfolgreicher Mutagenese wurde *TECI** in *S. cerevisiae*-Vektoren umklont.

4.2.4. Transformationsmethoden

4.2.4.1. Transformation von *E. coli*: "SOC-Methode" (modifiziert nach Mandel und Higa, 1970)

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen: In einem 1 l-Kolben wurden 250 ml SOB-Medium (2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄) mit 2 - 10 Kolonien angeimpft und bei 18°C mit 200 rpm inkubiert, bis eine OD_{595nm} von 0,6 erreicht war (ca. 24 Std.). Zum Ernten wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und mit 5000 ×g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Zellsediment wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure (HEPES) pH 6,7) resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und vorsichtig resuspendiert, bevor der Ansatz mit Dimethylsulfoxid bis zu einer Endkonzentration von 7% (w/v) versetzt wurde. Nach vorsichtigem Durchmischen folgte ein weiterer 10-minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Abschließend wurde der Ansatz aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformation der chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen: Die bei -80°C eingefrorenen *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Je 200 µl der Zellen wurden mit 0,2 - 1,0 µg Plasmid-DNA versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein 1-minütiger Hitzeschock bei 42°C und die Abkühlung der Zellen für 5 Minuten auf Eis. Dem Ansatz wurden 800 µl SOC-Medium (SOB-Medium mit 20 mM Glukose) zugefügt.

Es folgte 1 Std. Inkubation bei 37°C. Danach wurde die Zellen auf Selektivmedium plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.4.2. Transformation von *S. cerevisiae* (modifiziert nach Ito *et al.*, 1983)

Die Zellen des zu transformierenden Stammes wurden bei 30 °C über Nacht in 4 ml Selektivmedium angezogen. Die 10 ml-Hauptkultur wurde 1:50 beimpft und bis zu einer $OD_{595nm} = 0,6$ bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 Minuten bei 3000 ×g abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen mit 3 ml Li-Acetat / TE (0,1 M Li-Acetat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) gewaschen und schließlich in 300 µl Li-Acetat / TE aufgenommen. Je 100 µl kompetente Hefezellen wurden mit 5 µl frisch denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) sowie 0,2-5 µg DNA versetzt. Der Ansatz wurde mit 500 µl PEG 4000 / Li-Acetat in TE (50% (w/v) PEG 4000 in Li-Acetat / TE) vermischt, leicht geschüttelt und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach einem 15 - 20 -minütigen Hitzeschock bei 42°C wurden 500µl YEPD zugegeben und die Zellen 1 Minute bei 4000 ×g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml YEPD resuspendiert und 1 Std. bei 30°C inkubiert. Für die Integration von Geneticin-Resistenzkassetten wurde die Inkubationsdauer auf 2 Std. erhöht (Güldener *et al.*, 1996). Abschließend wurden die Zellen 15 Sekunden bei 3000 ×g zentrifugiert, nach Verwerfen des Überstandes in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

4.2.4.3. Transformation von *S. cerevisiae*: "One-step trafo" (Chen *et al.*, 1992)

Für einfache Transformationen mit guter Effizienz wurde ein verkürztes Protokoll genutzt: *S. cerevisiae*-Kulturen in stationärer Phase (auch von Festmedium) wurden pelletiert und in 100µl "One-step Puffer" (40% (w/v) PEG 4000, 100 mM DTT, 0,2 M Lithiumacetat, pH 5,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,1 - 1,0 µg Plasmid-DNA und 5 µl frisch denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 20 - 30 Minuten. Nach Zugabe von 0,9 ml YEPD wurden die Zellen bei 3000 ×g 1 Minute abzentrifugiert, nach Verwerfen des Überstandes in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

4.2.5. Analyse von RNA

4.2.5.1. Präparation von RNA (modifiziert nach Schmitt *et al.*, 1990)

Eine Vorkultur des zu untersuchenden Stammes wurde über Nacht bei 30°C in 4 ml Selektivmedium angezogen. Die 10 ml-Hauptkultur wurde 1:50 beimpft und bis zu einer

$OD_{595nm} = 0,6 - 1,0$ bei $30^{\circ}C$ inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt und bei $3000 \times g$ 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet entweder in flüssigen Stickstoff gefroren und bei $-80^{\circ}C$ archiviert oder direkt mit $400 \mu l$ Roti[®]-Phenol zur RNA-Isolierung (CARL ROTH), $400 \mu l$ AE / SDS (10 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, 50 mM Na-Acetat pH 5,3) und $200 \mu l$ Glasperlen (\varnothing 0,25-0,50 mm) gemischt. Der Aufbruch der Zellen erfolgte in 5 Minuten unter starkem Schütteln bei $65^{\circ}C$ auf einem "Thermomixer Compact" (EPPENDORF). Nach Zugabe von $200 \mu l$ AE wurden die Proben kurz auf Eis gekühlt und dann bei $4^{\circ}C$ 10 Minuten bei $13000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut mit $600 \mu l$ Roti[®]-Phenol zur RNA-Isolierung geschüttelt. Bei deutlich sichtbarer Interphase wurde dieser Schritt ein weiteres Mal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die RNA im Überstand mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 2,5 Volumen EtOH bei $-20^{\circ}C$ gefällt und anschließend bei $13000 \times g$ 15 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit kaltem 70%igen EtOH gewaschen und in $30 \mu l$ TE aufgenommen. Die Proben konnten bei $-80^{\circ}C$ gelagert werden.

4.2.5.2. Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese (modifiziert nach Rave *et al.*, 1979)

Die zu untersuchenden RNA-Proben wurden in einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt: $5 \mu g$ RNA (Volumen maximal $10 \mu l$) wurden mit $30 \mu l$ RNA-Probenpuffer (70% (v/v) Formamid, 10% (v/v) Glycerin, 20% (v/v) H_2O , etwas Bromphenolblau) gemischt und 15 Minuten bei $65^{\circ}C$ denaturiert. Nach einer kurzen Kühlung auf Eis wurden die Proben auf das Gel (1,4% (w/v) Agarose und 3% (v/v) Formaldehyd in MOPS (5 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 8% Formaldehyd, 230 mM 3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure pH 7,0)) aufgetragen und in MOPS / Formaldehyd (5 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 8% (v/v) Formaldehyd, 230 mM MOPS pH 7,0) elektrophoretisch bei 80 V für 3 Std. aufgetrennt.

4.2.5.3. Herstellung von Sonden-DNA

Zur Herstellung der Sonden-DNA wurde das "Prime-It[®] II Random Primer Labeling Kit" der Firma STRATAGENE gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet. Die benötigte DNA wurde durch PCR amplifiziert und nach einer Reinigung durch das QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) für die Sondenherstellung eingesetzt. Vor Zugabe zum Hybridisierungsansatz wurde die Sonde bei $95^{\circ}C$ 5 Minuten denaturiert und auf Eis abgekühlt.

4.2.5.4. Transfer und Hybridisierung von RNA: Northern-Hybridisierung

Transfer: Das Agarosegel wurde einmal in H₂O und 20 Minuten in 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat) gewaschen und die RNA anschließend durch einen mindestens vierstündigen Kapillarblot mit 20 x SSC auf eine "Hybond-N"-Nylonmembran (GE HEALTHCARE) transferiert. Die RNA wurde anschließend durch UV-Bestrahlung bei 254 nm mit 120.000 µJ/cm² (Stratalinker 1800, STRATAGENE) und 30-minütiges Erhitzen auf 80°C kovalent gebunden. Durch Färben mit Methylblau (0,04% (w/v) Methylblau in 0,5 M Na-Acetat pH 5,5) konnte der Erfolg des Blottens überprüft werden. Die Entfärbung erfolgte in destilliertem H₂O. **Hybridisierung:** Die Membran wurde dreimal in 25 ml Church-Puffer (7% (w/v) SDS, 1% (w/v) BSA, 1 mM EDTA, 250 mM Na-Phosphat pH 7,2) 1 Std. bei 65°C prähybridisiert und der Puffer jeweils anschließend verworfen. Nun wurde die mit [α -³²P]-dATP oder [α -³²P]-dCTP markierte Sonde in 25 ml Church-Puffer hinzugegeben und die RNA bei 65°C über Nacht mit der Sonden-DNA hybridisiert. Im Anschluss wurde die Membran zweimal 30 Minuten bei 65°C mit 0,1 fach SSC / 0,1% (w/v) SDS gewaschen und dann auf einem "Storage Phosphor Screen" (GE HEALTHCARE) exponiert. **Detektion:** Die Detektion der Signale erfolgte durch einen "Storm-860" Phosphoimager (GE HEALTHCARE) oder direkt durch Belichtung eines "Biomax MS-1 Röntgenfilms" (KODAK). **Quantifizierung:** Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe der "Quantity One[®] 4.6" Software (BIO-RAD INDUSTRIES GmbH). **"Strippen" von Northern-Hybridisierungen:** Um eine bereits hybridisierte Membran mit einer weiteren Sonde untersuchen zu können, wurde sie gestrippt: Dafür wurde die Membran dreimal 20 Minuten bei 80°C in 30 ml Strip-Lösung (1% (w/v) SDS in 0,1 x SSC) gewaschen. Nach erneuter Prähybridisierung konnte eine weitere Hybridisierung erfolgen.

4.2.6. Analyse von DNA

4.2.6.1. Sequenzierung von DNA (modifiziert nach Sanger *et al.*, 1977)

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde unter Verwendung des "ABI-Prism™ BigDye Ready Reaction Terminator Cycle Sequencing Kits" (APPLIED BIOSYSTEMS) durchgeführt. Es wurden 0,5 µg Plasmid-DNA, 2,0 µl Premix und 3-10 pmol des jeweiligen Sequenzierprimers gemischt und mit "HiPerSolv Chromanorm H₂O" (VWR) auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Die anschließende PCR folgte 25 Zyklen folgendem Temperaturprofil: 20 Sekunden 96°C, 15 Sekunden bei Primer-spezifischer Anlagerungstemperatur, 4 Minuten 72°C. Danach wurden die Ansätze mit 90 µl H₂O und 10 µl Na-Acetat (pH 4,6) versetzt, durch Zugabe von 250 µl 96%-igem EtOH gefällt und anschließend 30 Minuten bei 13000 ×g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde die DNA mit 250 µl 70%-igem EtOH gewaschen, erneut

bei $13000 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend getrocknet. Die Amplifikate wurde in $25 \mu\text{l}$ TSR-Puffer aufgenommen. Nach Denaturierung der DNA erfolgte die elektrophoretische Auftrennung und Detektion der Abbruchfragmente automatisch mit einem "ABI-310-Sequenzierapparat".

Auftragssequenzierungen von DNA wurden in der zweiten Hälfte dieser Arbeit von der Firma SEQUENCE LABORATORIES GmbH durchgeführt.

4.2.6.2. Southern-Hybridisierung (Southern, 1975)

Für die Southern-Hybridisierung wurden ca. $10 \mu\text{g}$ chromosomaler DNA 12 Std. in einer geeigneten Restriktion geschnitten. Die Fragmente wurde in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. **Transfer:** Das Gel wurde zweimal 15 Minuten in $0,25 \text{ M HCl}$ gewaschen, kurz mit H_2O abgespült, in $0,5 \text{ M NaOH} / 1,0 \text{ M NaCl}$ 30 Minuten und in $1 \text{ M NH}_4\text{OAc} / 0,02 \text{ M NaOH}$ zweimal 30 Minuten gewaschen. Die DNA wurde nun durch einen mindestens vierstündigen Kapillarblot auf eine Nylonmembran "Hybond-N" (GE HEALTHCARE) transferiert. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung bei 254 nm mit $120.000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ (Stratalinker 1800, STRATAGENE) und 30-minütiges Erhitzen auf 80°C kovalent gebunden. **Hybridisierung:** Die Membran wurde zweimal mit 30 ml Church-Puffer ($7\% \text{ (w/v) SDS}$, $1\% \text{ (w/v) BSA}$, 1 mM EDTA , $250 \text{ mM Na-Phosphat pH } 7,2$) 1 Std. bei 65°C prähybridisiert und der Puffer anschließend verworfen. Nun wurde die mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ oder $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ radioaktiv markierte DNA-Sonde in 50 ml Church-Puffer hinzugegeben und die Hybridisierung bei 65°C über Nacht durchgeführt. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die Membran zweimal 30 Minuten bei 65°C mit 0,1-fach SSC (15 mM NaCl , $1,5 \text{ mM Natriumcitrat}$) / $0,1\% \text{ (w/v) SDS}$ gewaschen und dann auf einem "Storage Phosphor Screen" (GE HEALTHCARE) exponiert. **Detektion:** Die Detektion der Signale erfolgte durch einen "Storm-860" Phosphoimager (GE HEALTHCARE) oder direkt durch Belichtung eines "Biomax MS-1 Röntgenfilms" (KODAK).

4.2.7. Heterologe Expression und Affinitätschromatographie von Proteinen

4.2.7.1. Tec1¹⁻²⁸⁰

Expression von *HIS-GST-TEC1*¹⁻²⁸⁰: Die heterologe Expression von *HIS-GST-TEC1*¹⁻²⁸⁰ erfolgte durch das Plasmid BHUM0780 in BL21(DE3)-Star-pLysS: Die Vorkultur aus LB mit Kanamycin und Chloramphenicol wurde bei 37°C über Nacht angezogen. Die Hauptkultur bestand aus dem gleichen Medium und wurde bei 20°C bis zu einer $\text{OD}_{595} = 0,4$ inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von $0,05 \text{ mM}$

IPTG für 4 Std. bei 20°C. Danach wurden die Zellen auf Eis gekühlt, 15 Minuten bei 6000 ×g und 4°C pelletiert und in Bindepuffer (500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 50 mM Tris pH 7,5) resuspendiert. **Reinigung von Tec1¹⁻²⁸⁰**: Das Fusionsprotein HIS-GST-Tec1¹⁻²⁸⁰ wurde über GSH-Sepharose (GE HEALTHCARE) gereinigt, mit TEV-Protease (INVITROGEN) prozessiert, Tec1¹⁻²⁸⁰ in einer Nickel-IMAC ("Immobilized-metal affinity chromatography") von den Epitopen HIS-GST separiert und durch eine Gelfiltration aufkonzentriert. **GST-Affinitätschromatographie**: Die Zellen wurden in einem Fluidizer (GAU) aufgebrochen. Anschließend wurde der Proteinrohextrakt 30 Minuten bei 108000 ×g zentrifugiert und der Überstand mit Bindepuffer auf eine maximale Proteinkonzentration von 20 mg/ml verdünnt. Die Affinitätsbindung an GSH-Sepharose erfolgte mit einer maximalen Flussrate von 1 ml/min an einer ÄKTA EXPLORER P900 (GE HEALTHCARE). Beim Waschen des Säulenmaterials mit 10 Volumen des Bindepuffers wurde die Flussrate sukzessive bis auf 4 ml/min erhöht, wobei der maximale Druck auf das Säulenmaterial nicht über 1 MPa stieg. Die Elution erfolgte danach mit Elutionspuffer (307 mg Glutathion und 40 µl 10 M NaOH in 50 ml Bindepuffer pH 7,5) bei einer maximalen Flussrate von 1 ml/min in einen Fraktionssammler. **Ni²⁺-IMAC**: Durch Inkubation bei 4°C mit TEV-Protease wurde das HIS-GST-Epitop über Nacht von Tec1¹⁻²⁸⁰ abgespalten. Das EDTA des Bindepuffers wurde durch Dialyse um den Faktor 100 verdünnt. Anschließend wurde die mit NiCl₂ beladene NTA-Agarose (QIAGEN) mit dem Extrakt des prozessierten Fusionsproteins beschickt und der Durchfluss fraktioniert. Waschen und Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch ansteigende Konzentration von Imidazol im Puffer (15mM - 500mM). **Gelfiltration**: Das Tec1¹⁻²⁸⁰-Protein aus der Ni²⁺ IMAC wurde mit einer VIVAspin 20 10.000 MWCO (SARTORIUS) aufkonzentriert und durch Dialyse umgepuffert (500 mM NaCl, 2 mM DTT, 20 mM 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonsäure (HEPES) pH 7,5). Es folgte eine Gelfiltration 16/60 mit Superdex 75 (GE HEALTHCARE) bei einer Durchflussrate von 1 ml/min an einer ÄKTA EXPLORER P900. Die Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt überprüft, vereinigt und mit einer VIVAspin 20 10.000 MWCO auf 10 mg/ml einkonzentriert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.7.2. MBP-Tec1-FLAG

Expression von MBP-TECI-FLAG: Die Plasmide BHUM0388 (*MBP-TECI-FLAG*) oder BHUM0390 (*MBP-FLAG*) wurden in *E. coli* BL21 DE3-STAR-pLysS transformiert und in einer Vorkultur aus LB mit Ampicillin und Chloramphenicol bei 37°C über Nacht angezogen. Die Hauptkultur (1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Glukose) wurden als Selektivmedium mit der Vorkultur beimpft und bei 20°C bis zu einer OD₅₉₅ = 0,5 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM IPTG für 4 Std. bei 20°C. Danach wurden die Zellen auf Eis gekühlt,

15 Minuten bei 6000 ×g und 4°C pelletiert und in Bindepuffer (500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 50 mM Tris pH 7,5) resuspendiert. **Reinigung von MBP-Tec1-FLAG:** Der Zellaufschluss erfolgte in einem Fluidizer (GAU). Anschließend wurde der Proteinrohextrakt 30 Minuten bei 108000 ×g zentrifugiert und der Überstand mit Bindepuffer auf eine maximale Proteinkonzentration von 20 mg/ml verdünnt. Die Affinitätsbindung an "Amylose Resin" (NEW ENGLAND BIOLABS) erfolgte mit einer maximalen Flussrate von 1 ml/min an einer ÄKTA EXPLORER P900 (GE HEALTHCARE). Beim Waschen des Säulenmaterials mit 10 Volumen des Bindepuffers wurde die Flussrate sukzessive bis auf 3 ml/min erhöht, wobei der maximale Druck auf das Säulenmaterial nicht über 1 MPa stieg. Die Elution erfolgte danach mit Bindepuffer, dem 10 mM Maltose zugesetzt wurden, bei einer maximalen Flussrate von 1 ml/min in einen Fraktionssammler. Über eine VIVAspin 20 50.000 MWCO (SARTORIUS) (für MBP-Tec1-FLAG) bzw. 10.000 MWCO (für MBP-FLAG) wurde eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration erreicht. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.8. α -Tec1: Produktion und Reinigung des Antikörpers

Das gereinigte Tec1¹⁻²⁸⁰-Protein wurde für ein Immunisierungsprotokoll verwendet. Dafür wurden zuvor zwei Kaninchen ausgewählt, deren Präimmunsereen im Western-Blot, insbesondere auf Höhe von Tec1, nur geringe Kreuzreaktionen mit Proteinrohextrakt aus *S. crevisiae* zeigten. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht und ein Standard Immunisierungsprotokoll des PINEDA ANTIKÖRPERSERVICE verfolgt. Nach vier Monaten wurde das Serum gewonnen und weiter aufgereinigt. Hierfür wurde das Ausgangsprotein Tec1¹⁻²⁸⁰ auf eine Nitrocellulosemembran als Affinitätsträger gebロットet und die Membran mit TBS/BSA (140 mM NaCl, 3% (w/v) BSA, 20 mM Tris pH 7,5) geblockt. Diese Membran wurde in 1:10 verdünntem Serum für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit TBS/BSA gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte durch Glycin-Puffer (0,2 M Glycin, 1 mM EDTA, pH 2,5), der anschließend mit Tris-Puffer (pH 7,5) neutralisiert wurde. Durch Mischen dieser Lösung mit einem *tec1Δ*-Proteinextrakt (aus YHUM0610) wurden weitere unspezifisch bindende Antikörper abgefangen. Zum Schluss wurden die so gewonnenen Antikörperlösungen beider Tiere 1:1 gemischt, um die spezifischen Tec1-Signale zu intensivieren und die unspezifischen Signale beider Immunsereen zu minimieren. Die optimale Einsatzmenge der Antikörperlösung wurde empirisch als 1:5000 ermittelt. Der Antikörper zeigte sich dabei hoch spezifisch (siehe Ergebnisse ab 2.2.).

4.2.9. Analyse von Proteinen

4.2.9.1. Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für den photometrischen β -Galaktosidasetest (Rose und Botstein, 1983)

Der zu untersuchende Stamm wurde über Nacht bei 30°C in 4 ml Selektivmedium angezogen. Die 10 ml-Hauptkultur wurde 1:50 beimpft und bis zu einer $OD_{595nm} = 0,6$ bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt und bei 3000 \times g 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Sediment in 1 ml Aufbruchpuffer (20% Glycerin, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) gewaschen und in 250 μ l Aufbruchpuffer mit 1 mM DTT resuspendiert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren oder direkt in einem Reaktionsgefäß mit 200 μ l Glasperlen (\varnothing 0,25-0,50 mm) durch Schütteln für 5 Minuten bei 4°C auf einem "IKA® Vibrax Basic" aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden danach durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 13000 \times g bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde quantitativ in eine 96-Well Mikrotiterplatte (SARSTEDT) überführt und konnte kurzzeitig bis zu seiner weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden.

4.2.9.2. Photometrischer β -Galaktosidasetest (Rose und Botstein, 1983)

Zur quantitativen Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurden in einer Mikrotiterplatte 10 μ l der erstellten Proteinextrakte mit 200 μ l Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$) versetzt. Als Reduktionsmittel wurde jeweils frisch 0,25% (v/v) β -Mercaptoethanol zugesetzt. Der Start der Reaktion wurde durch Zugabe von 40 μ l o-NPG (4 mg/ml in Z-Puffer) ausgelöst. Der Reaktionsansatz wurde bei 30°C inkubiert, bis eine Gelbfärbung erkennbar war. Durch Zugabe von 100 μ l 1 M Na_2CO_3 -Lösung wurde die Reaktion abgestoppt, die Reaktionszeit vermerkt und die optische Dichte bei 420 nm gemessen. Parallel wurde die Proteinkonzentration der Proben nach Bradford (1976) ermittelt. Die spezifische Aktivität des Proteinextraktes folgt aus:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{OD_{420nm} \cdot 1,7}{0,0045 \cdot \text{Protenkonz. (mg/ml)} \cdot \text{Extraktvol. (ml)} \cdot \text{Zeit (min)}}$$

Dabei entspricht die OD_{420nm} der gemessenen Extinktion des Produktes o-Nitrophenol. Der Faktor 1,7 korrigiert das Reaktionsvolumen und der Faktor 0,0045 repräsentiert den Extinktionskoeffizienten von 1 nmol/ml o-Nitrophenol-Lösung.

4.2.9.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von gereinigten Tec1-Derivaten wurde mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten des Proteins (berechnet durch Sequenzanalyse auf <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) und dem Spektrophotometer "Nano Drop 1000" (PEQ-LAB) ermittelt.

Der Proteingehalt von Zell-Extrakten wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit BSA als Proteinstandard bestimmt. 10 µl des Proteinextraktes wurden mit 300 µl Bradford-Reagenz der Firma BIO-RAD INDUSTRIES GmbH (5% (v/v) EtOH, 10% (v/v) H₃PO₄, 0,007% (w/v) Serva Blue G) vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und mit einem BSA-Standard der Konzentrationen 0,1 – 2 mg/ml abgeglichen.

4.2.9.4. Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für die immunochemische Detektion: Mechanischer Zellaufbruch (Roberts *et al.*, 1997)

Eine Vorkultur des zu untersuchenden Stammes wurde über Nacht bei 30°C in 4 ml Selektivmedium angezogen. Die 10 ml-Hauptkultur wurde 1:50 beimpft und bis zu einer OD_{595nm} = 0,6 bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt und bei 3000 ×g 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 1 ml Aufbruchpuffer (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) gewaschen und in 250 µl Aufbruchpuffer mit 1 mM DTT und "Complete Protease Inhibitor Cocktail" (ROCHE) resuspendiert. Die Zellen konnten bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren oder direkt in einem Reaktionsgefäß mit 200 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) durch Schütteln für 3 Minuten bei 4°C auf einem "IKA® Vibrax Basic" aufgebrochen werden. Nach Zugabe von weiteren 150 µl Aufbruchpuffer mit Zusatz von 0,08% (v/v) Triton X-100 und erneutem Schütteln, wurden die Zelltrümmer durch 15-minütiges Zentrifugieren mit 13000 ×g bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford (1976) bestimmt. 60 µl des Extraktes wurden mit 30 µl 3-fach SDS-Ladepuffer (15% (v/v) β-Mercaptoethanol, 7% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,25 M Tris-HCl pH 6,8) versetzt und für 5 Minuten auf 75°C erhitzt. Die Proben konnten bei -20°C aufbewahrt werden.

4.2.9.5. Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* für die immunochemische Detektion: Chemischer Zellaufbruch

Um das Proteom im Anschluss an ein Experiment schnell denaturieren und etwaige Modifikationsformen der Proteine erhalten zu können, wurde eine Präparationsmethode nach Vorbild von Kushnirov (2000) etabliert: Eine Vorkultur des zu untersuchenden

Stammes wurde über Nacht bei 30°C in 4 ml Selektivmedium angezogen. Die 10 ml-Hauptkultur wurde 1:50 beimpft und bis zu einer $OD_{595nm} = 0,6$ bei 30°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension kurz auf Eis gekühlt und eine Zellmenge äquivalent zu $OD_{595} = 2,5$ durch Zentrifugation bei $3000 \times g$ und 4°C geerntet. Die Zellen wurden in 200 µl 0,1 M NaOH resuspendiert und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation für 1 Minute bei $3000 \times g$ pelletiert. Der eigentlich Aufbruch erfolgte durch Resuspendierung der Zellen in 100 µl SDS-Ladepuffer (10% (v/v) Glycerin, 2,5% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,003% (w/v) Bromphenolblau, 80 mM Tris-HCl pH 6,8) und die Erhitzung auf 98°C für 5 Minuten. Nach einer kurzen Abkühlphase auf Eis wurde der Rohextrakt für 15 Minuten bei $13000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand für die SDS-PAGE eingesetzt. Die Proben konnten bei -20°C aufbewahrt werden.

4.2.9.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese "SDS-PAGE" (modifiziert nach Laemmli, 1970)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Vertikalgelen im "Mini Protean® 3" System (BIO-RAD INDUSTRIES GmbH). Diese Gele bestanden aus dem Sammelgel (10% (v/v) Rotiphorese® Gel-30 (CARL ROTH) in 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS) und dem Trenngel (33% (v/v) Rotiphorese® Gel-30 in 375 mM Tris pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS). Die Auftrennung der Proben in Elektrophorese-Puffer (25 mM Tris-Base, 250 mM Glycin, 0,1% SDS) erfolgte bei einer Anfangsspannung von 110 V für etwa 15 Minuten und dann, abhängig von der Größe des zu untersuchenden Proteins, für 35 bis 50 Minuten bei 200 V. Der "Precision Plus Protein Standard" (BIO-RAD INDUSTRIES GmbH) wurde als Protein-Standard verwendet.

4.2.9.7. Immunochemische Detektion von Proteinen: "Western-Analyse" (Towbin *et al.*, 1979)

Transfer: Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran wurde durch Elektroblothing für 1 Std. bei 100 V und 4°C (oder 30 V bei Raumtemperatur über Nacht) in einer "Mini Trans Blot Electrophoretic Cell" (BIO-RAD INDUSTRIES GmbH) in Transfer-Puffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 0,01% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol) durchgeführt. Es wurde eine "Protran"-Nitrocellulosemembran (SCHLEICHER & SCHUELL) verwendet. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran 1 Minuten in PonceauS-Lösung (0,1% PonceauS, 3% (w/v) Trichloressigsäure) gefärbt. Zum Entfernen des Farbstoffs wurde die Membran anschließend mehrfach für 10 Minuten in TBS

(140 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5) mit 5% (w/v) Magermilchpulver gewaschen. **Antikörper-Bindung:** Nach vollständiger Entfärbung wurde die Nitrocellulosemembran 1 Std. in TBS / 5% Milchpulver geblockt. Danach wurde die Membran mit 10 ml TBS / 5% Milchpulver und dem Primärantikörper (siehe Tabelle 7) in einem 50 ml Reaktionsgefäß (SARSTEDT) je nach Bedarf 2-18 Std. bei 4°C auf einem "SRT6-Roller" (BIO-RAD INDUSTRIES GmbH) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit 25 ml TBS gewaschen und dann für mindestens 1 Std. mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 8) inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte für 5 Minuten mit 25 ml TBS, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. **ECL-Nachweis:** Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte nach der ECL-Methode (Tesfaigzi *et al.*, 1994): Für diesen Nachweis der Antikörper wurden eine Luminol-Lösung (2,5 mM Luminol, 400 µM Paracuomarat, 100 mM Tris-HCl pH 8,5) und eine Wasserstoffperoxid-Lösung (5,4 mM H₂O₂, 100 mM Tris-HCl pH 8,5) einzeln angesetzt, vereinigt und zusammen mit der Antikörper-behandelten Nitrocellulosemembran 1 Minute inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte durch Exponierung auf einem "Hyperfilm-ECL™" (GE HEALTHCARE). Die Expositionsdauer richtete sich nach der Signalstärke. **Quantifizierung:** Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit Hilfe der "Quantity One® 4.6" Software (BIO-RAD INDUSTRIES GmbH).

Tabelle 7: Primärantikörper

Antigen	Art	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle
Cdc42	Polyklonal	Kaninchen	1:1000	SANTA CRUZ BIOTECH.
Cdc28	Polyklonal	Ziege	1:1000	SANTA CRUZ BIOTECH.
GST	Polyklonal	Kaninchen	1:1000* ¹	SANTA CRUZ BIOTECH.
Kss1	Polyklonal	Ziege	1:1000	SANTA CRUZ BIOTECH.
Myc	Monoklonal	Maus	1:200	AG MÖSCH
Tec1	Polyklonal	Kaninchen	1:5000	Diese Arbeit / PINEDA

*¹ Die TBS-Puffer für diese Antikörper enthielten 0,1% (v/v) Tween 20.

Tabelle 8: Sekundärantikörper

Antigen	Modifikation	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus	HRC-konjugiert	Ziege	1:5000	SANTA CRUZ BIOTECH.
Kaninchen	HRC-konjugiert	Ziege	1:5000	SANTA CRUZ BIOTECH.
Ziege	HRC-konjugiert	Esel	1:5000	SANTA CRUZ BIOTECH.

"Strippen" der Nitrocellulosemembran: Um bereits immunochemisch behandelte Nitrocellulosemembranen einem weiteren Antikörpernachweis unterziehen zu können, wurden die bereits gebundenen Antikörper von der Membran entfernt. Dafür wurden sie dreimal 15 Minuten in Glycin-Puffer (0,2 M Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 1% (v/v)

TWEEN20, pH 2,2 mit 25% HCl eingestellt) gewaschen und dreimal 5 Minuten in TBS pH 7,5 neutralisiert. Danach wurde die Membran erneut für 30 Minuten in TBS / 5% Milchpulver geblockt, bevor sie mit einem neuen Primärantikörper inkubiert wurden.

4.2.9.8. Co-Affinitätsreinigung: "GST-Pulldown" (Roberts *et al.*, 1997)

Die B3111-tragenden Hefestämme wurden in 5 ml Selektivmediums bei 30°C über Nacht angezogen und dann zum Animpfen (1:30) der 50 ml Hauptkultur verwendet. In der Regel dauerte die anschließende Inkubation bei 30°C etwa 4-6 Stunden, bis eine OD_{595nm} von 0,8 erreicht war. Die Zellen wurden anschließend für 5 Minuten bei 3000 ×g zentrifugiert, in 50 ml Selektivmedium mit 2% Galaktose resuspendiert und darin für 3-4 Stunden bei 30°C inkubiert. Es folgte ein Abkühlen auf Eis und das Ernten der Zellen bei 3000 ×g. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C bzw. auf Eis. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen zweimal in 2,5 ml B-Puffer (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl B-Puffer mit "Complete Protease Inhibitor Cocktail" (ROCHE) resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß mit 250 µl Glasperlen (Ø 0,25-0,50 mm) überführt. Der Aufschluss erfolgte durch 3-minütiges Schütteln auf einem "IKA® Vibrax Basic". Der Suspension wurden weitere 300 µl eines Gemischs aus B-Puffer / Proteaseinhibitor und 0,08% Triton X-100 zugesetzt und sie wurde erneut geschüttelt. Danach folgte ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13000 ×g. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 60 µl des Extraktes wurden mit 30 µl 3-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Dieser Rohextrakt diente als Ladekontrolle. Weitere 300 µl des Extraktes wurden mit 800 µl B-Puffer / Proteaseinhibitor / Triton X-100 in einem Reaktionsgefäß mit 50 µl vorgelegter "Glutathion-Sepharose™ 4B" (GE HEALTHCARE) gemischt und mit Glycerin auf eine Endkonzentration von 10% (v/v) gebracht. Die Inkubation erfolgte unter langsamer Drehbewegung bei 4°C für mindestens 1 Std.. Danach wurde der Ansatz vorsichtig viermal in 200µl B-Puffer / Triton X-100 gewaschen, wobei die Zentrifugationsschritte nur bei 2000 ×g erfolgten. Nach Beendigung des letzten Zentrifugationsschrittes wurde die Glutathion-Sepharose mit 100 µl 1,5-fach SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten auf 80°C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wurden 10-35 µl des Extraktes für die SDS-PAGE geladen.

4.2.9.9. Messung der *in vitro*-Phosphorylierung: "Kinase Assay"

Kss1 und Fus3 wurden als GST-Fusionsproteine aus Kulturen vor und 30 Minuten nach Zugabe von 0,5 µM α-Faktor gewonnen. Isolation und Reinigung der Proteine erfolgte analog zum Vorgehen, wie unter 4.2.9.8. Co-Affinitätsreinigung: "GST-Pulldown" beschrieben. Der Isolationspuffer war jedoch mit den "Phosphatase Inhibitor

Cocktails I und II" (GE HEALTHCARE) versetzt. Die "Glutathion-Sepharose™ 4B" (GE HEALTHCARE) wurde dreimal mit 100 µl Kinase-Puffer gewaschen (20 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM Na₃VO₄, 50 mM Tris-HCL pH 7,5) und dann in 100 µl Kinase-Puffer aufgenommen. 25 µl dieser Suspension wurden mit 200 ng gereinigtem Tec1-Protein auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 µCi [γ -³²P]-ATP gestartet und 20 Minuten bei 30°C inkubiert. Stoppen der Reaktion und Lösung des gebundenen Proteins erfolgte durch Zugabe von 25 µl 3-fach konzentriertem SDS-Ladepuffer und 5-minütiger Inkubation der Probe bei 80°C. Nach einer SDS-PAGE konnte das gebundene ³²P mit einem "Biomax MS-1 Röntgenfilm" (KODAK) nachgewiesen werden.

4.2.9.10. Silberfärbung (modifiziert nach Blum und Cross, 1987)

Ein SDS-Polyacrylamid-Gel wurde mindestens 2 Std. fixiert (40% (v/v) EtOH, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) H₂O) und anschließend dreimal 20 Minuten in 30% (v/v) EtOH gewaschen. Das Gel wurde 1 Minute in Thiosulfatlösung (0,02% (w/v) Natriumthiosulfat in H₂O) inkubiert, dreimal 20 Sekunden in destillierten H₂O gewaschen, 20 Minuten mit Silbernitratlösung (0,02% (w/v) Silbernitrat in H₂O) behandelt und zweimal in destilliertem H₂O gewaschen. Die Entwicklung (3% (w/v) Natriumcarbonat, 0,05% (v/v) Formaldehydlösung (37%), 0,0004% (w/v) Natriumthiosulfat in H₂O) erfolgte üblicherweise in zwei bis fünf Minuten. Nach zwei kurzen Waschschritten in destilliertem H₂O wurde das Gel 30 Minuten in Stopplösung (0,5% (w/v) Glycin in H₂O) gelegt. Das gefärbte Gel wurde photographisch dokumentiert und bei Bedarf in einem Vakuum-Geltrockner (BIOMETRA) getrocknet.

4.2.10. Untersuchung von *S. cerevisiae*

4.2.10.1. Waschtest zur Bestimmung des haploiden adhäsiven Wachstums (Roberts und Fink, 1994)

Die betreffenden Stämme wurden großflächig auf YEPD oder entsprechendem Selektivmedium ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Die Agarplatten wurden nach unterschiedlichen Zeiträumen (1-6 Tagen) photographisch dokumentiert (CANON "Powershot 620A"). Anschließend wurden die Platten vorsichtig unter einem sanften Strahl deionisierten Wassers geschwenkt, wobei nicht-adhäsive Stämme gewaschen wurden. Optional wurden weitere, stärker werdende Waschschriffe angeschlossen. Nach Abschluss eines jeden Waschschriffes wurde das Ergebnis photographisch dokumentiert

4.2.10.2. Halo-Test (modifiziert nach Elion *et al.*, 1990)

Der Pheromon-induzierte Zellzyklusarrest wurde durch einen Test nachgewiesen, der die Stärke der Wachstumsblockierung anhand des Durchmessers eines Hemmhofes (Halo) zeigt. Eine Übernachtskultur der *S. cerevisiae*-Stämme in Selektivmedium wurde 1:10 verdünnt, und 200 µl der Suspension wurden auf Vollmedium plattiert. Auf die Agaroberfläche wurden kleine Plättchen aus Filterpapier (SCHLEICHER & SCHUELL) gelegt, die zuvor mit 5 µl α-Faktor (2 mM in Methanol) behandelt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 30°C, die Dokumentation photographisch.

4.2.10.3. Fluoreszenzmikroskopie

Eine Vorkultur des GFP-Fusionsprotein-exprimierenden Stammes wurde über Nacht bei 30°C in 4 ml Selektivmedium angezogen. Die 10 ml-Hauptkultur aus "Low Fluorescence Yeast Medium" (Sheff und Thorn, 2004) wurde 1:50 beimpft und bis zu einer $OD_{595nm} = 0,6$ bei 30°C inkubiert. Gegebenenfalls wurden die Kulturen hier aufgeteilt und mit bzw. ohne Rapamycin weiter inkubiert. Für die eigentliche Untersuchung wurden Proben der Kulturen auf einen Objektträger gebracht, abgedeckt und mit nicht-fluoreszierendem Nagellack versiegelt. Für die Aufnahmen wurde ein "Axiovert 200M" (ZEISS) mit einer "Orca ER" (HAMAMATSU) verwendet. Die Software "Volocity 4" war von IMPROVISION.

4.3. Bezugsquellen

Die für diese Arbeit genutzten Produkte wurden von folgenden Firmen bezogen:

APPLIED BIOSYSTEMS GmbH (Darmstadt, D)	MICROBIA (Cambridge, Massachusetts, USA)
BIOMETRA (Göttingen, D)	NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt, D)
BIO-RAD INDUSTRIES GmbH (München, D)	NOVAGEN (MERCK, DARMSTADT, D)
CANON (Krefeld, D)	PEQ-LAB (Erlangen, D)
CARL ROTH GmbH & CO KG (Karlsruhe, D)	PINEDA ANTIKÖRPERSERVICE (Berlin, D)
EPPENDORF (Hamburg, D)	PROMEGA (Madison, WI, USA)
FERMENTAS (St. Leon-Rot, D)	QIAGEN (Hilden, D)
FINNZYMES (Espoo, FIN)	ROCHE GmbH (Mannheim, D)
GAU (Göttingen, D)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. (Santa Cruz, USA)
GE HEALTHCARE (München, D)	SARSTEDT (Nürnberg, D)
HAMAMATSU (Herrsching am Ammersee, D)	SARTORIUS (Göttingen, D)
HARTMANN ANALYTIC GmbH (Braunschweig, D)	SCHLEICHER & SCHUELL (Dassel, D)
IMPROVISION (Tübingen, D)	SEQUENCE LABORATORIES GmbH (Göttingen, D)
INVITROGEN (Karlsruhe, D)	STRATAGENE (Amsterdam, NL)
KODAK (Stuttgart, D)	VWR (Darmstadt, D)
LC-LABORATORIES, New Boston, USA	ZEISS (Göttingen, D)
METABION (Martinsried, D)	

5. LITERATUR

- Amon A.**, Tyers M., Fitcher B., Nasmyth K. (1993). Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* 24: 74(6): 993-1007.
- Anbanandam A.**, Albarado D. C., Nguyen C. T., Halder G., Gao X., Veeraraghavan S. (2006). Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 14: 103(46): 17225-30.
- Andrade M. A.**, Bork P. (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* 11: 115-116.
- Andrade M. A.**, Petosa C., O'Donoghue S. I., Muller C. W., Bork P. (2001). Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.* 309: 1-18.
- Aravind L.**, Koonin E. V. (2000). The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol.* 10: 132-34.
- Ash J.**, Wu C., Larocque R., Jamal M., Stevens W., Osborne M., Thomas D.Y., Whiteway M. (2003). Genetic analysis of the interface between Cdc42p and the CRIB domain of Ste20p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163: 9-20.
- Audhya A.**, Loewith R., Parsons A. B., Gao L., Tabuchi M., Zhou H., Boone C., Hall M. N., Emr S. D. (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 23: 3747-57.
- Bao, M.Z.**, Schwartz, M.A., Cantin, G.T., Yates, J.R., 3rd, and Madhani, H.D. (2004). Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell* 119, 991-1000.
- Barbet N. C.**, Schneider U., Helliwell S. B., Stansfield I., Tuite M. F., Hall M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell* 7: 25-42.
- Bardwell L.**, Cook J. G., Voora D., Baggott D. M., Martinez A. R., Thorner J. (1998). Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev.* 12, 2887-98.
- Bardwell A.J.**, Flatauer L.J., Matsukuma K., Thorner J., Bardwell L. (2001). A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J. Biol. Chem.* 276, 10374-86.
- Bardwell L.** (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 26: 339-50.
- Baur M.**, Esch R. K., Errede B. (1997). Cooperative binding interactions required for function of the Ty1 sterile responsive element. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4330-37.
- Beck T.**, Hall M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient- regulated transcription factors. *Nature* 402, 689-92.
- Beck T.**, Schmidt A., Hall M. N. (1999 b). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell. Biol.* 146: 1227-38.
- Beck T.**, Delley P. A., Hall M. N. (2001) Control of the actin cytoskeleton by extracellular signals. *Results Probl. Cell Differ.* 32: 231-62.
- Berset C.**, Trachsel H., Altmann M. (1998). The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4264-69.
- Blum H. B.**, Gross H. J. (1987). Improved silver staining method of Plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Boeke J. D.**, Garfinkel D. J., Styles C. A., Fink G. R. (1985). Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 40: 491-500.
- Boeke J. D.** (1989). Transcription and reverse transcription of retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.* 43: 403-34.
- Bölker M.** (2001). *Ustilago maydis* - a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395-1401.

- Bosotti R.**, Isacchi A., Sonnhammer E. L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* 25: 225-27.
- Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Braus G.**, Grundmann O., Brückner S., Mösch H. U. (2003). Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and *FLO11* gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14: 4272-84.
- Bray S.** (1999). *Drosophila* development: Scalloped and vestigial take wing. *Curr. Biol.* 9: 245-47.
- Breitkreutz, A.**, Boucher, L., Tyers, M. (2001). MAPK specificity in the yeast pheromone response independent of transcriptional activation. *Curr. Biol.* 11: 1266-71.
- Brewster J. L.**, de Valoir T., Dwyer N. D., Winter E., Gustin M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760-63.
- Brückner S.**, Köhler T., Braus G., Heise B., Bolte M., Mösch H. U. (2004). Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Curr. Genet.* 46: 331-42.
- Bürglin T. R.** (1991). The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. *Cell* 12: 66(1): 11-12.
- Butcher F. R.**, Potter V. R. (1972) Control of the adenosine 3',5'-monophosphate-adenyl cyclase system in the livers of developing rats. *Cancer Res.* 32: 2141-47.
- Cafferkey R.**, Young P. R., McLaughlin M. M., Bergsma D. J., Koltin Y., Sathe G. M., Faucette L., Eng W. K., Johnson R. K., Livi G. P. (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6012-23.
- Campbell S. D.**, Duttaroy A., Katzen A. L., Chovnick A. (1991). Cloning and characterization of the scalloped region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 127(2): 367-80.
- Campbell S.**, Inamdar M., Rodrigues V., Raghavan V., Palazzolo M., Chovnick A. (1992). The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 6(3): 367-79.
- Cannon J. F.**, Tatchell K. (1987). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 7: 2653-63.
- Cardenas M. E.**, Heitman J. (1995). FKBP12-rapamycin target TOR2 is a vacuolar protein with an associated phosphatidylinositol-4 kinase activity. *EMBO J.* 14: 5892-5907.
- Cardenas M. E.**, Cutler N. S., Lorenz M. C., Di Como C. J., Heitman J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13: 3271-79.
- Caro L. H.**, Tettelin H., Vossen J. H. , Ram A. F. , van den Ende H., Klis F. M. (1997). *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13(15): 1477-89.
- Chang A.**, Cheang S., Espanel X., Sudol M. (2000). Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 275: 20562-71.
- Chen D.C.**, Yang B. C. Kuo T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* 21: 83-84.
- Chen E. J.**, Kaiser C. A. (2003). Lst8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *J. Cell Biol.* 161: 333-47.
- Chen J. C.**, Powers T. (2006). Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* 49: 281-93.
- Cherkasova V. A.**, Hinnebusch A. G. (2003). Translational control by TOR and *TAP42* through dephosphorylation of eIF2 α kinase Gcn2. *Genes Dev.* 17: 859-72.
- Chou S.**, Huang L., Liu H. (2004). Fus3-regulated Tec1 degradation through SCF Cdc4 determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell* 119: 981-90.

- Chou S., Lane S., Liu H. (2006).** Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26(13): 4794-4805.
- Cliften P., Sudarsanam P., Desikan A., Fulton L., Fulton B., Majors J., Waterston R., Cohen B. A., Johnston M. (2003).** Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* 301: 71-76.
- Colombo S., Ma P., Cauwenberg L., Winderickx J., Crauwels M., Teunissen A., Nauwelaers D., de Winde J. H., Gorwa M. F., Colavizza D., Thevelein J. M. (1998).** Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 3326-41.
- Company M., Adler C., Errede B. (1988).** Identification of a Tyl regulatory sequence responsive to *STE7* and *STE12*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2545-54.
- Cook J. G., Bardwell L., Kron S. J., Thorner J. (1996).** Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 10: 2831-48.
- Cook J. G., Bardwell L., Thorner J. (1997).** Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* 390: 85-88.
- Coschigano P. W., Magasanik B. (1991).** The *URE2* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. *Mol. Cell Biol.* 11: 822-32.
- Courchesne W. E., Magasanik B. (1988).** Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes. *J. Bacteriol.* 170: 708-13.
- Cox K. H., Rai R., Distler M., Daugherty J. R., Coffman J. A., Cooper T. G. (2000).** *Saccharomyces cerevisiae* GATA sequences function as TATA elements during nitrogen catabolite repression and when Gln3p is excluded from the nucleus by overproduction of Ure2p. *J. Biol. Chem.* 275: 17611-18.
- Crespo J. L., Daicho K., Ushimaru T., Hall M. N. (2001).** The GATA transcription factors Gln3 and Gat1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 276: 34441-44.
- Crespo J. L., Powers T., Fowler B., Hall M. N. (2002).** The TOR-controlled transcription activators Gln3, Rtg1, and Rtg3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6784-89.
- Crespo J. L., Helliwell S. B., Wiederkehr C., Demougin P., Fowler B., Primig M., Hall M. N. (2004).** Npr1 kinase and Rsp5-Bul1/2 ubiquitin ligase control Gln3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279: 37512-17.
- Cross F. R., Hoek M., McKinney J. D., Tinkelenberg A. H. (1994).** Role of Swi4 in cell cycle regulation of *CLN2* expression. *Mol. Cell Biol.* 14(7): 4779-87.
- Cullen P. J., Sprague G. F. (2000).** Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13619-24.
- Cunningham T. S., Andhare R., Cooper T. G. (2000).** Nitrogen catabolite repression of *DAL80* expression depends on the relative levels of Gat1p and Ure2p production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275: 14408-14414.
- Cutler N. S., Pan X., Heitman J., Cardenas M. E. (2001).** The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol. Biol. Cell* 12: 4103-4113.
- Danaie P., Altmann M., Hall M. N., Trachsel H., Helliwell S. B. (1999).** *CLN3* expression is sufficient to restore G1-to-S phase progression in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in translation initiation factor eIF4E. *Biochem. J.* 340: 135-41.
- De Craene J. O., Soetens O., Andre B. (2001).** The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J. Biol. Chem.* 276: 43939-48.
- De Virgilio C., Loewith R. (2006).** Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25: 6392-6415.

- deHart** A. K., Schnell J. D., Allen D. A., Tsai J. Y., Hicke L. (2003). Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Mol. Biol. Cell* 14: 4676-84
- Dennis** P. B., Jaeschke A., Saitoh M., Fowler B., Kozma S. C., Thomas G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294: 1102-05.
- Di Como** C. J., Arndt K. T. (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* 10: 1904-16.
- Dirick** L., Bohm T., Nasmyth K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14(19):4803-13.
- Dubois** E., Jacobs E., Jauniaux J.C. (1982). Expression of the ROAM mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of trans-acting regulatory elements and relation with the Ty1 transcription. *EMBO J.* 1 (9): 1133-9
- Dubouloz** F., Deloche O., Wanke V., Cameroni E., De Virgilio C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol. Cell* 19: 15-26.
- Dujon** B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neueglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouard V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J. M., Beyne E., Bleykasten C., Boisrame A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., De Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire M., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J. M., Nikolski M., Oztas S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potier S., Richard G. F., Straub M. L., Suleau A., Swennen D., Tekaiia F., Wesolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P., Souciet J. L. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430: 35-44.
- Dunn** R., Hicke L. (2001). Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 12: 421-35.
- Düvel** K., Santhanam A., Garrett S., Schnepfer L., Broach J. R. (2003). Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast. *Mol. Cell* 11: 1467-78.
- Elion** E. A., Grisafi P. L., Fink G. R. (1990). *FUS3* encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60: 649-64.
- Elion** E. A., Brill J. A., Fink G. R. (1991). Functional redundancy in the yeast cell cycle: Fus3 and Kss1 have both overlapping and unique functions. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 56: 41-49.
- Elion** E. A., Satterberg B., Kranz J. E. (1993). Fus3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for Ste12 and Far1. *Mol. Biol. Cell* 4: 495-510.
- Engelberg** D., Klein C., Martinetto H., Struhl K., Karin M. (1994). The UV response involving the Ras signaling pathway and AP-1 transcription factors is conserved between yeast and mammals. *Cell* 77: 381-90.
- Ernst** J. F., Schmidt A. (2000). Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts. Karger: Basel.
- Errede** B., Gartner A., Zhou Z., Nasmyth K., Ammerer G. (1993). MAP kinase-related Fus3 from *S. cerevisiae* is activated by Ste7 in vitro. *Nature* 362: 261-64.
- Esch** R.K., Errede B. (2002). Pheromone induction promotes Ste11 degradation through a MAPK feedback and ubiquitin-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9160-65.
- EUROSCARF**, European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis, Institute for Microbiology, Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Marie-Curie-Strasse 9; Building N250, 60439 Frankfurt, Germany
- Evans** T., Rosenthal E. T., Youngblom J., Distel D., Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389-96.
- Fadri** M., Daquinag A., Wang S., Xue T., Kunz J. (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol. Biol. Cell* 16: 1883-1900.

- Fang Y.**, Vilella-Bach M., Bachmann R., Flanigan A., Chen J. (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294: 1942-45.
- Farrance I.**, Ordahl C. P. (1996). The role of transcription enhancer factor-1 (TEF-1) related proteins in the formation of M-CAT binding complexes in muscle and non-muscle tissues. *J. Biol. Chem.* 271: 8266-74.
- Feller A.**, Boeckstaens M., Marini A. M., Dubois E. (2006). Transduction of the nitrogen signal activating Gln3-mediated transcription is independent of Npr1 kinase and Rsp5-Bul1/2 ubiquitin ligase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281: 28546-54.
- Fields S.**, Herskowitz I. (1985). The yeast *STE12* product is required for expression of two sets of cell-type specific genes. *Cell* 42: 923-30.
- Finley D.**, Sadis S., Monia B. P., Boucher P., Ecker D. J., Crooke S. T., Chau V. (1994). Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Mol. Cell Biol.* 14: 5501-09.
- Freifelder D.** (1960). Bud position in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 124: 511-23.
- Gallagher E.**, Gao M., Liu Y.C., Karin M. (2006). Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 1717-22.
- Gartner A.**, Nasmyth K., Ammerer G. (1992). Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of Fus3 and Kss1. *Genes Dev.* 6: 1280-92.
- Gasch A. P.**, Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G., Botstein D., Brown P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* 11: 4241-57.
- Gavrias V.**, Andrianopoulos A., Gimeno C. J., Timberlake W. E. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol. Microbiol.* 19:1255-63.
- Gehring W. J.**, Quian Y. Q., Billeter M., Furukubo-Tokunaga K., Schier A. F., Resendez-Perez D., Affolter M., Otting G., Wüthrich K. (1994). Homeodomain-DNA Recognition. *Cell* 78: 211-23.
- Ghaemmaghami S.**, Huh W. K., Bower K., Howson R. W., Belle A., Dephoure N., O'Shea E. K., Weissman J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-41.
- Gimeno C. J.**, Ljungdahl P. O., Styles C. A., Fink G. R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. *Cell* 68: 1077-90.
- Gimeno C. J.**, Fink G. R. (1994). Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development. *Mol. Cell. Biol.* 14(3): 2100-12.
- Goffeau A.**, Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 546: 563-567.
- Goossens A.**, Dever T. E., Pascual-Ahuir A., Serrano R. (2001). The protein kinase Gcn2p mediates sodium toxicity in yeast. *J. Biol. Chem.* 276: 30753-60.
- Groves M. R.**, Hanlon N., Turowski P., Hemmings B. A., Barford D. (1999). The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. *Cell* 96: 99-110.
- Güldener U.**, Heck S., Fielder T., Beinhauer J., Hegemann J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24: 2519-24.
- Güldener U.**, Heinisch J., Köhler G. J., Voss D., Hegemann J. H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 30(6): e23.
- Guo B.**, Styles C. A., Feng Q., Fink G. R. (2000). A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell-adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12158-63.

- Gupta M.P.**, Kogut P., Gupta M. (2000). Protein kinase-A dependent phosphorylation of transcription enhancer factor-1 represses its DNA-binding activity but enhances its gene activation ability. *Nucleic Acids Res.* 28: 3168-77.
- Gustin M. C.**, Albertyn J., Alexander M., Davenport K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(4): 1264-1300.
- Haitani Y.**, Shimoï H., Takagi H. (2006). Rsp5 regulates expression of stress proteins via post-translational modification of Hsf1 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 580: 3433-38.
- Han J.**, Jiang Y., Li Z., Kravchenko V. V., Ulevitch R. J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* 386: 296-99.
- Hanahan D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-80.
- Hara K.**, Maruki Y., Long X., Yoshino K., Oshiro N., Hidayat S., Tokunaga C., Avruch J., Yonezawa K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110: 177-89.
- Harbison C. T.**, Gordon D. B., Lee T. I., Rinaldi N. J., Macisaac K. D., Danford T. W., Hannett N. M., Tagne J. B., Reynolds D. B., Yoo J., Jennings E. G., Zeitlinger J., Pokholok D. K., Kellis M., Rolfe P. A., Takusagawa K. T., Lander E. S., Gifford D. K., Fraenkel E., Young R. A. (2004). Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* 431: 99-104.
- Hardwick J. S.**, Kuruvilla F. G., Tong J. K., Shamji A. F., Schreiber S. L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14866-70.
- Heitman J.**, Movva N. R., Hall M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253: 905-09.
- Helliwell S. B.**, Wagner P., Kunz J., Deuter-Reinhard M., Henriquez R., Hall M. N. (1994). Tor1 and Tor2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5: 105-18.
- Helliwell S. B.**, Howald I., Barbet N., Hall M. N. (1998). Tor2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 148: 99-112.
- Helliwell S. B.**, Losko S., Kaiser C. A. (2001). Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease. *J. Cell Biol.* 153: 649-62.
- Hinnebusch A. G.** (1992). General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In the molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression, J. R. Broach, E. W. Jones, and J. R. Pringle. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hinnebusch A. G.** (1997). Translational regulation of yeast *GCN4*. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* 272: 21661-64.
- Hinnebusch A. G.**, Natarajan K. (2002). Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryotic Cell* 1: 22-32.
- Hinnebusch A. G.** (2005). Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 407-50.
- Ho Y.**, Gruhler A., Heilbut A., Bader G. D., Moore L., Adams S. L., Millar A., Taylor P., Bennett K., Boutilier K., Yang L., Wolting C., Donaldson I., Schandorff S., Shewnarane J., Vo M., Taggart J., Goudreault M., Muskat B., Alfarano C., Dewar D., Lin Z., Michalickova K., Willems A. R., Sassi H., Nielsen P. A., Rasmussen K. J., Andersen J. R., Johansen L. E., Hansen L. H., Jaspersen H., Podtelejnikov A., Nielsen E., Crawford J., Poulsen V., Sorensen B. D., Matthiesen J., Hendrickson R. C., Gleeson F., Pawson T., Moran M. F., Durocher D., Mann M., Hogue C. W., Figeys D., Tyers M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415: 180-83.
- Hoffman C. S.**, Winston F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-72.

- Hohmann S.** (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microl. Mol. Biol. Rev.* 66: 300-72.
- Holmes D. S., Quigley M.** (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-97.
- Holstege F. C., Jennings E. G., Wyrick J. J., Lee T. I., Hengartner C. J., Green M. R., Golub T. R., Lander E. S., Young R. A.** (1998). Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell* 95: 717-28.
- Hoppe T., Matuschewski K., Rape M., Schlenker S., Ulrich H. D., Jentsch S.** (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* 102: 577-86.
- Horak J.** (2003). The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1614: 139-55.
- Hsu D. K., Guo Y., Alberts G. F., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Peifley K. A., Winkles J. A.** (1996). Identification of a murine TEF-1-related gene expressed after mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts and during myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* 271: 13786-95.
- Huibregtse J. M., Scheffner M., Beaudenon S., Howley P. M.** (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2563-67.
- Hung W., Olson K. A., Breitskreutz A., Sadowski I.** (1997). Characterization of the basal and pheromone-stimulated phosphorylation states of Ste12p. *Europ. J. Biochem.* 245: 241-51.
- Ingham R. J., Gish G., Pawson T.** (2004). The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture. *Oncogene* 23: 1972-84.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Irie K., Takase M., Lee K. S., Levin D. E., Araki H., Matsumoto K., Oshima Y.** (1993). *MKK1* and *MKK2*, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3076-83
- Ishiji T., Lacey M. J., Parkkinen S., Anderson R. D., Haugen T. H., Cripe T. P., Xiao J. H., Davidson I., Chambon P., Turek L. P.** (1992). Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 11: 2271-81.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153: 163-68.
- Iwamoto M. A., Fairclough S. R., Rudge S. A., Engebrecht J.** (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Sps1p regulates trafficking of enzymes required for spore wall synthesis. *Eukaryot. Cell.* 4:536-44.
- Jacinto E., Guo B., Arndt K. T., Schmelzle T., Hall M. N.** (2001). Tip41 interacts with Tap42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol. Cell* 8: 1017-26.
- Jiang S. W., Wu K., Eberhardt N. L.** (1999). Human placental TEF-5 transactivates the human chorionic somatomammotropin gene enhancer. *Mol. Endocrinol.* 13: 879-89.
- Jiang S.W., Dong M., Trujillo M.A., Miller L.J., Eberhardt N.L.** (2001). DNA binding of TEA/ATTS domain factors is regulated by protein kinase C phosphorylation in human choriocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 276: 23464-70.
- Jiang Y., Broach J. R.** (1999). Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* 18: 2782-92.
- Kaneko K. J., DePamphilis M. L.** (1998). Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors. *Dev. Genet.* 22: 43-55.
- Kataoka T., Powers S., Cameron S., Fasano O., Goldfarb M., Broach J., Wigler M.** (1984). Functional homology of mammalian and yeast *RAS* genes. *Cell* 40: 19-26.

- Kato Y.**, Kravchenko V. V., Tapping R. I., Han J., Ulevitch R. J., Lee J. D. (1997). Bmk1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor Mef2C. *EMBO J.* 16: 7054-66.
- Kee Y.**, Lyon N., Huibregtse J. M. (2005). The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme. *EMBO J.* 24: 2414-24.
- Kee Y.**, Munoz W., Lyon N., Huibregtse J. M. (2006). The deubiquitinating enzyme Ubp2 modulates Rsp5-dependent Lys63-linked polyubiquitin conjugates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281: 36724-31.
- Kee Y.**, Huibregtse J. M. (2007). Regulation of catalytic activities of HECT ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 329-33.
- Keith C. T.**, Schreiber S. L. (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270: 50-51.
- Kern S.** (2006). Regulation des Transkriptionsfaktors Tec1 aus *Saccharomyces cerevisiae* durch den TOR-Signalweg. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Keyse S. M.** (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:186-92
- Klein S.**, Reuveni H., Levitzki A. (2000). Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3219-23.
- Koegl M.**, Hoppe T., Schlenker S., Ulrich H. D., Mayer T. U., Jentsch S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-44.
- Köhler T.**, Wesche S., Taheri N., Braus G. H., Mösch H. U. (2002). Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. *Eukaryot. Cell* 1: 673-86.
- Koltin Y.**, Faucette L., Bergsma D. J., Levy M. A., Cafferkey R., Koser P. L., Johnson R. K., Livi G. P. (1991). Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 11: 1718-23.
- Komeili A.**, Wedaman K. P., O'Shea E. K., Powers T. (2000). Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J. Cell Biol.* 151: 863-78.
- Kraakman L.**, Lemaire K., Ma P., Teunissen A. W., Donaton M. C., Van Dijck P., Winderickx J., de Winde J. H., Thevelein J. M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32: 1002-12.
- Krisak L.**, Strich R., Winters R. S., Hall J. P., Mallory M. J., Kreitzer D., Tuan R. S., Winter E. (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 8: 2151-61.
- Kron S. J.**, Styles C. A., Fink G. R. (1994). Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 5: 1003-22.
- Kronstad J. W.**, Holly J. A., MacKay V. L. (1987). A yeast operator overlaps an upstream activation site. *Cell* 50: 369-77.
- Kübler E.**, Mösch H.-U., Rupp S., Lisanti M. P. (1997). Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 272: 20321-23.
- Kubota H.**, Obata T., Ota K., Sasaki T., Ito T. (2003). Rapamycin-induced translational derepression of *GCN4* mRNA involves a novel mechanism for activation of the eIF2 kinase Gen2. *J. Biol. Chem.* 278: 20457-60.
- Kuchin S.**, Vyas V. K., Carlson M. (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate *FLO11*, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol. Cell Biol.* 22: 3994-4000.

- Kunz J.**, Henriquez R., Schneider U., Deuter-Reinhard M., Movva N. R., Hall M. N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585-96.
- Kunz J.**, Schneider U., Howald I., Schmidt A., Hall M. N. (2000). HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *J. Biol. Chem.* 275: 37011-20.
- Kuranda K.**, Leberre V., Sokol S., Palamarczyk G., François J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol. Microbiol.* 61: 1147-66.
- Kushnirov V. V.** (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16: 857-860.
- Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
- Laloux I.**, Dubois E., Dewerchin M., Jacobs E. (1990). *TECI*, a gene involved in the activation of Tyl and Tyl-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: Cloning and molecular analysis. *Mol. Cell Biol.* 10: 3541-50.
- Laloux I.**, Jacobs E., Dubois E. (1994). Involvement of SRE element of Tyl1 transposon in *TECI*-dependent transcriptional activation. *Nuc. Acid Res.* 22: 999-1005.
- Lambrechts M.**, Bauer F. F., Marmur J., Pretorius I. S. (1996). Muc1, a mucin like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8419-24.
- Lange C.A.**, Shen T., Horwitz K.B. (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1032-37.
- Lee K. S.**, Levin D. E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell Biol.* 12:172-82.
- Lee K. S.**, Irie K., Gotoh Y., Watanabe Y., Araki H., Nishida E., Matsumoto K., Levin D. E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 13: 3067-75.
- Leeuw T.**, Wu C., Schrag J. D., Whiteway M., Thomas D. Y., Leberer E. (1998). Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* 391: 191-95.
- Liu Z.**, Sekito T., Epstein C. B., Butow R. A. (2001). RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO J.* 20: 7209-19.
- Lo W. S.**, Dranginis A. M. (1996). *FLO11*, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.* 178: 7144-51.
- Lo H. J.**, Köhler J. R., DiDomenico B., Loebenberg D., Cacciapuoti A., Fink G. R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-49.
- Lo W. S.**, Dranginis, A. M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9: 161-71.
- Loeb J. D.**, Kerentseva T. A., Pan T., Sepulveda-Becerra M, Liu H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins are differentially involved in invasive and pseudohyphal growth independent of the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway. *Genetics* 153: 1535-46.
- Loewith R.**, Jacinto E., Wullschlegler S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell* 10: 457-68.
- Lorenz M. C.**, Heitman J. (1997). Yeast pseudohyphal growth is regulated by Gpa2, a G protein alpha homolog. *EMBO J.* 16: 7008-18.
- Luke M. M.**, Della Seta F., Di Como C. J., Sugimoto H., Kobayashi R., Arndt K. T. (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the Sit4 phosphatase. *Mol. Cell Biol.* 16: 2744-55.

- Madhani H. D., Fink G. R. (1997).** Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* 275: 1314-17.
- Madhani H. D., Styles C. A., Fink G. R. (1997 b).** MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* 91: 673-84.
- Madhani H. D., Galitski T., Lander E. S., Fink G. R. (1999).** Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12530-35.
- Magasanik B., Kaiser C. A. (2002).** Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290: 1-18.
- Mandel M., Higa A. (1970).** Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159-62.
- Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (1982).** Molecular Cloning. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mar J. H., Ordahl C. P. (1990).** M-CAT binding factor, a novel trans-acting factor governing muscle-specific transcription. *Mol. Cell Biol.* 10: 4271-83.
- Marbach I., Licht R., Frohnmeier H., Engelberg D. (2001).** Gcn2 mediates Gcn4 activation in response to glucose stimulation or UV radiation not via *GCN4* translation. *J. Biol. Chem.* 276: 16944-51.
- Martin D. E., Souillard A., Hall M. N. (2004).** TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the forkhead transcription factor Fhl1. *Cell* 119: 969-79.
- Martin D.E., Demougin P., Hall M.N., Bellis M. (2004).** Rank Difference Analysis of Microarrays (RDM), a novel approach to statistical analysis of microarray expression profiling data. *BMC Bioinformatics* 5: 148.
- Marton M. J., DeRisi J. L., Bennett H. A., Iyer V. R., Meyer M. R., Roberts C. J., Stoughton R., Burchard J., Slade D., Dai H. (1998).** Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat. Med.* 4: 1293-1301.
- Melese T., Hieter P. (2002).** From genetics and genomics to drug discovery: yeast rises to the challenge. *Trends Pharmacol. Sci.* 23: 544-47.
- Metodiev M. V., Matheos D., Rose M. D., Stone D. E. (2002).** Regulation of MAPK function by direct interaction with the mating-specific G-alpha in yeast. *Science* 296: 1483-86.
- Mirabito P. M., Adams T. H., Timberlake W. E. (1989).** Interaction of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development. *Cell* 57: 859-68.
- Morgan D. O. (1995).** Principles of CDK regulation. *Nature* 374: 131-34.
- Mösch H.-U., Scheier B., Lahti R., Mäntsälä P., Braus G. H. (1991).** Transcriptional activation of yeast nucleotide biosynthetic gene *ADE4* by Gcn4. *J. Biol. Chem.* 266: 20453-56.
- Mösch H.-U., Fink G.R. (1997).** Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 145: 671-84.
- Mösch H.-U., Kübler E., Krappmann S., Fink G. R., Braus G. H. (1999).** Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10: 1325-35.
- Naider F., Becker J.M. (2004).** The alpha-factor mating pheromone of *Saccharomyces cerevisiae*: a model for studying the interaction of peptide hormones and G protein-coupled receptors. *Peptides* 25: 1441-63.
- Nash P., Tang X., Orlicky S., Chen Q., Gertler F. B., Mendenhall M. D., Sicheri F., Pawson T., Tyers M. (2001).** Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* 414: 514-21.
- Nasmyth K. (1996).** Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* 274: 1643-45.
- Nasmyth K. (1996 b).** At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* 12: 405-12.
- Natarajan K., Meyer M. R., Jackson B. M., Slade D., Roberts C., Hinnebusch A. G., Marton M. J. (2001).** Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell Biol.* 21: 4347-68.

- Nern A.**, Arkowitz R.A. (1999). A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating. *J. Cell Biol.* 144: 1187-1202.
- Niederberger P.**, Miozzari G., Hütter R. (1981). Biological role of the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 1: 584-93.
- Oehlen L.**, Cross F. R. (1998). The mating factor response pathway regulates transcription of *TECI*, a gene involved in pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 429: 83-88.
- Olson K. A.**, Nelson C., Tai G., Hung W., Yong C., Astell C., Sadowski I. (2000). Two regulators of Ste12p inhibit pheromone-responsive transcription by separate mechanisms. *Mol. Cell Biol.* 20: 4199-4209.
- Omura F.**, Kodama Y. (2004). The N-terminal domain of yeast Bap2 permease is phosphorylated dependently on the Npr1 kinase in response to starvation. *FEMS Microbiol. Lett.* 230: 227-34.
- Orlova M.**, Kanter E., Krakovich D., Kuchin S. (2006). Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 5: 1831-37.
- Ozcan S.**, Johnston M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 554-69.
- Pan X.**, Heitman J. (2000). Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol. Cell Biol.* 20: 8364-72.
- Pan X.**, Heitman J. (1999). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19: 4874-87.
- Pedrucci I.**, Dubouloz F., Cameroni E., Wanke V., Roosen J., Winderickx J., De Virgilio C. (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol. Cell* 12: 1607-13.
- Peng T.**, Golub T. R., Sabatini D. M. (2002). The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell Biol.* 22: 5575-84.
- Peter M.**, Gartner A., Horecka J., Ammerer G., Herskowitz I. (1993). Far1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* 73: 747-60.
- Peter M.**, Herskowitz I. (1994). Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* 265: 1228-31.
- Pramila T.**, Wu W., Miles S., Noble W. S., Breeden L. L. (2006). The forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. *Genes Dev.* 20: 2266-78.
- Prowse C.N.**, Lew J. (2001). Mechanism of activation of ERK2 by dual phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276: 99-103.
- Pryciak P.M.**, Huntress F.A. (1998). Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev.* 12: 2684-97.
- Ptacek J.**, Devgan G., Michaud G., Zhu H., Zhu X., Fasolo J., Guo H., Jona G., Breitkreutz A., Sopko R. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438: 679-84.
- Rai R.**, Cooper T. G. (2005). *In vivo* specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22: 343-58.
- Ramezani Rad M.**, Jansen G., Buhning F., Hollenberg C. P. (1998). Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol. Gen. Genet.* 259: 29-38.
- Rave N.**, Crkvenjakov R., Boedtker H. (1979). Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzoyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res.* 6: 3559-67.
- Reinke A.**, Anderson S., McCaffery J. M., Yates J., Aronova S., Chu S., Fairclough S., Iverson C., Wedaman K. P., Powers T. (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279: 14752-62.

- Reinke A.**, Chen J. C., Aronova S., Powers T. (2006). Caffeine targets TOR complex 1 and provides evidence for a regulatory link between the FRB and kinase domains of Tor1p. *J. Biol. Chem.* 281: 31616-26.
- Rempola B.**, Kaniak A., Migdalski A., Rytka J., Slonimski P. P., di Rago J. P. (2000). Functional analysis of *RRD1* (YIL153w) and *RRD2* (YPL152w), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 1081-92.
- Reynolds T. B.**, Fink G. R. (2001). Baker's yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878-81.
- Richly H.**, Rape M., Braun S., Rumpf S., Hoegel C., Jentsch S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects Cdc48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120: 73-84.
- Roberg K. J.**, Bickel S., Rowley N., Kaiser C. A. (1997). Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by Sec13, Lst4, Lst7 and Lst8. *Genetics* 147: 1569-84.
- Roberts R. L.**, Fink G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* 8: 2974-85.
- Roberts R. L.**, Mösche H.-U., Fink G. R. (1997). 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* 89: 1055-65.
- Robertson L. S.**, Fink G. R. (1998). The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13783-87.
- Robertson L. S.**, Causton H. C., Young R. A., Fink G. R. (2000). The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5984-88.
- Robzyk K.**, Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* 20: 3790.
- Rohde J. R.**, Campbell S., Zurita-Martinez S. A., Cutler N. S., Ashe M., Cardenas M. E. (2004). TOR controls transcriptional and translational programs via Sap-Sit4 protein phosphatase signaling effectors. *Mol. Cell Biol.* 24: 8332-41.
- Ronne H.**, Carlberg M., Hu G. Z., Nehlin J. O. (1991). Protein phosphatase 2A in *S. cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 11: 4876-84.
- Rose M.**, Botstein D. (1983). Construction and use of gene fusions to lacZ (β -galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol.* 101: 167-80.
- Rossomando A. J.**, Payne D. M., Weber M. J., Sturgill T. W. (1988). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6940-43.
- Rupp S.**, Summers E., Lo H., Madhani H., Fink G. R. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* 18: 1257-69.
- Sabbagh W.**, Flatauer L. J., Bardwell A. J., Bardwell L. (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol. Cell* 8: 683-91.
- Saeki Y.**, Isono E., Toh E. A. (2005). Preparation of Ubiquitinated Substrates by the PY Motif-Insertion Method for Monitoring 26S Proteasome Activity. *Methods Enzymol.* 399: 215-27.
- Saiki R. K.**, Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-54.
- Sanger F. S.**, Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-67.
- Santhanam A.**, Hartley A., Düvel K., Broach J. R., Garrett S. (2004). PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryot. Cell* 3: 1261-71.
- Scheffner M.**, Nuber U., Huibregtse J. M. (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 373: 81-83.
- Schmelzle T.**, Beck T., Martin D. E., Hall M. N. (2004). Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol. Cell Biol.* 24: 338-51.

- Schmidt A.**, Beck T., Koller A., Kunz J., Hall M. N. (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates Npr1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.* 17: 6924-31.
- Schmitt M. E.**, Brown T. A., Trumppower B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 18: 3091-92.
- Schwartz M. A.**, Madhani H. D. (2006). Control of MAPK signaling specificity by a conserved residue in the MEK-binding domain of the yeast scaffold protein Ste5. *Curr. Genet.* 49: 351-63.
- Shamji A. F.**, Kuruvilla F. G., Schreiber S. L. (2000). Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr. Biol.* 10: 1574-81.
- Sharrocks A. D.**, Yang S. H., Galanis A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.* 25: 448-53.
- Shcherbik N.**, Kee Y., Lyon N., Huibregtse J. M., Haines D. S. (2004). A single PXY motif located within the carboxyl terminus of Spt23p and Mga2p mediates a physical and functional interaction with ubiquitin ligase Rsp5p. *J. Biol. Chem.* 279: 53892-98.
- Sheff M. A.**, Thorn K. S. (2004). Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21: 661-70.
- Sherman F.**, Fink G. R., Hicks J. (1986). Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Soetens O.**, De Craene J. O., Andre B. (2001). Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1. *J. Biol. Chem.* 276: 43949-57.
- Songyang Z.**, Lu K. P., Kwon Y. T., Tsai L. H., Filhol O., Cochet C., Brickey D. A., Soderling T. R., Bartleson C., Graves D. J., DeMaggio A. J., Hoekstra M. F., Blenis J., Hunter T., Cantley L.C. (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell Biol.* 16:6486-93.
- Southern E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-17.
- Stuart D.**, Wittenberg C. (1994). Cell cycle-dependent transcription of *CLN2* is conferred by multiple distinct cis-acting regulatory elements. *Mol. Cell Biol.* 14: 4788-801.
- Sturgill T. W.**, Ray L. B. (1986). Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 565.
- Sutton A.**, Immanuel D., Arndt K. T. (1991). The Sit4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol. Cell Biol.* 11: 2133-48.
- Tate J. J.**, Rai R., Cooper T. G. (2006). Ammonia-specific regulation of Gln3 localization in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase Npr1. *J. Biol. Chem.* 281: 28460-69.
- Tedford K.**, Kim S., Sa D., Stevens K., Tyers M. (1997). Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr. Biol.* 7: 228-38.
- Terrell J.**, Shih S., Dunn R., Hicke L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* 1: 193-202.
- Tesfaigzi J.**, Smith-Harrison W., Carlson D. M. (1994). A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* 17: 268-69.
- Thevelein J. M.**, de Winde J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33: 904-18.
- Thevelein J. M.**, Gelade R., Holsbeeks I., Lagatie O., Popova Y., Rolland F., Stolz F., Van de Velde S., Van Dijck P., Vandormael P. (2005). Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 253-56.
- Thomas B. J.**, Rothstein R. (1989). Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56: 619-30.

- Toda T.**, Uno I., Ishikawa T., Powers S., Kataoka T., Broek D., Cameron S., Broach J., Matsumoto K., Wigler M. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40: 27-36.
- Toda T.**, Cameron S., Sass P., Zoller M., Wigler M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50: 277-87.
- Torres J.**, Di Como C. J., Herrero E., de la Torre-Ruiz M. A. (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 277: 43495-504
- Towbin H.**, Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-54.
- Tsuzuki J.**, Newburgh R. W. (1975) Inhibition of 5'-nucleotidase in rat brain by methylxanthines. *J. Neurochem.* 25: 895-96.
- Valenzuela L.**, Aranda C., Gonzalez A. (2001). TOR modulates Gcn4-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J. Bacteriol.* 183: 2331-34.
- Van Arsdell S. W.**, Stetler G. L., Thorner J. (1987). The yeast repeated element sigma contains a hormone-inducible promoter. *Mol. Cell. Biol.* 7: 749-59.
- Van Hoof C.**, Martens E., Longin S., Jordens J., Stevens I., Janssens V., Goris J. (2005). Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem. J.* 386: 93-102.
- Wang, G.**, Yang, J., and Huijbregtse, J.M. (1999). Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell Biol.* 19: 342-52.
- Wanke V.**, Pedruzzi I., Cameroni E., Dubouloz F., De Virgilio C. (2005). Regulation of G0 entry by the Pho80-Pho85 cyclin-CDK complex. *EMBO J.* 24: 4271-78.
- Ward M. P.**, Gimeno C. J., Fink G. R., Garrett S. (1995). Sok2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. *Mol. Cell Biol.* 15: 6854-63.
- Watanabe Y.**, Takaesu G., Hagiwara M., Irie K., Matsumoto K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.* 17: 2615-23.
- Wedaman K. P.**, Reinke A., Anderson S., Yates J., McCaffery J. M., Powers T. (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14: 1204-20.
- Westfall P. J.**, Ballou D. R., Thorner J. (2004). When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science* 306: 1511-12.
- Wilkinson M. G.**, Pino T. S., Tournier S., Buck V., Martin H., Christiansen J., Wilkinson D. G., Millar J. B. (1999). Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J.* 18: 4210-21.
- Wittenberg C.**, Sugimoto K., Reed S. I. (1990). G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34 Cdc28 protein kinase. *Cell* 62: 225-37.
- Wu J.**, Duggan A., Chalfie M. (2001). Inhibition of touch cell fate by egl-44 and egl-46 in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15: 789-802.
- Wullschleger S.**, Loewith R., Oppliger W., Hall M. N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J. Biol. Chem.* 280: 30697-704.
- Wullschleger S.**, Loewith R., Hall M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-84.
- Xiao J. H.**, davidson I., Matthes H., Garnier J.-M., Chambon P. (1991). Cloning, expression and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* 65: 551-68.
- Yan G.**, Shen X., Jiang Y. (2006). Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J.* 25: 3546-55.

- Yang R.**, Wek S. A., Wek R. C. (2000). Glucose limitation induces *GCN4* translation by activation of Gen2 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 20: 2706-17.
- Yang S. H.**, Sharrocks A. D., Whitmarsh A. J. (2003). Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320: 3-21.
- Yuan Y. L.**, Fields S. (1991). Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste12 protein. *Mol. Cell Biol.* 11: 5910-18.
- Zeitlinger J.**, Simon I., Harbison C. T., Hannett N. M., Volkert T. L., Fink G. R., Young R. A. (2003). Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell* 113: 395-404.
- Zheng X. F.**, Florentino D., Chen J., Crabtree G. R., Schreiber S. L. (1995). TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* 82: 121-30.
- Zheng Y.**, Jiang Y. (2005). The yeast phosphotyrosyl phosphatase activator is part of the Tap42-phosphatase complexes. *Mol. Biol. Cell* 16: 2119-27.

Danksagungen

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H.-U. Mösch danke ich vor allem für seinen fachlichen Rat, die Freiräume, die er mir in der Forschung gewährt hat, und seinen menschlichen Zuspruch.

Bei Herrn Prof. Dr. M. Bölker bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens; bei Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. A. Batschauer für ihre Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Für fruchtbare Kooperationen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Braus (Göttingen) und Prof. Dr. K. Brehm (Würzburg); bei Herrn Prof. Dr. C. DeVirgilio (Genf), Herrn PD Dr. S. Irniger (Göttingen) und Herrn PD Dr. R. Schaffrath (Halle) für die Überlassung zahlreicher Stämme und Plasmide.

Für die gute Zusammenarbeit in der aufreibenden Zeit von Planung und Umbau der neuen Abteilung danke ich Dr. Anne Krappmann und Dr. Melanie Heinrich.

Dr. Tim Köhler und Dr. Markus Rudolph möchte ich an dieser Stelle für ihre Ratschläge danken, die mich vor allem am Anfang dieser Arbeit vor einigen Fehlern bewahrt haben; meinen drei Diplomanden Barbara Heise, Raphael Birke und Sandra Kern dafür, dass sie sich nicht abschrecken ließen und nun in der Abteilung an ihrer Promotion arbeiten.

Aus der Nachbarabteilung der AG Bölker danke ich besonders Dr. Michael Mahlert, Dr. Björn Sandrock und Kai Schink für zahlreiche kleine Hilfen im Zusammenhang mit dieser Arbeit.

Meinem sozialen und wissenschaftlichen Umfeld aus Göttingen und Marburg danke ich für Rat und Hilfe im Labor sowie für zahlreiche schöne Stunden außerhalb: Dank an Dr. Katrin Bömeke-Streckfuß, Dr. Claudia Fischer, Gabriele Heinrich, Dr. Malte Kleinschmidt, Julian König, PD Dr. Sven Krappmann, Maria Meyer, Dr. Annett Struß, Verena Pretz, Dr. Oliver Valerius und Dr. Katharina Zarnack.

Meinem sozialen und völlig unwissenschaftlichen Umfeld aus Nordhessen danke ich für verlässliche Freundschaft und das Gefühl, bei ihm im Urlaub zu sein: Dank an Dirk Brede, Jessica Böß, Karin Freitag, Corinna Gergen, Lars Möller, Jens Reese, und Oliver & Rene Siebert.

Zuletzt danke ich meinem Onkel Albrecht Armbrust (†), der mich jetzt bestimmt "Alter Angeber!" genannt hätte, und meinen Eltern Iris & Georg Brückner für alles, was hier nicht steht und mir unglaublich wichtig ist!

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Georg Stefan Brückner
Geburtsdatum: 24.02.1975
Geburtsort: Kassel

Schulbildung:

1981 - 1985 Lilli-Jahn-Grundschule Immenhausen
1985 - 1992 Freiherr-vom-Stein-Gesamtschule Immenhausen
1992 - 1995 Elisabeth-Knippling-Schule Kassel
1995 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

1995 - 1996 Zivildienst beim ASB Kassel und der Käthe-Kollwitz-Schule Hofgeismar

Studium:

1996 - 2001 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
2002 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen unter Leitung von PD Dr. H.-U. Mösch

Promotion:

seit 2003 Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-U. Mösch am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität zu Göttingen und am Fachbereich Biologie, Abteilung für Molekulare Genetik, der Philipps-Universität Marburg. Thema: "Regulation des TEA/ATTS-Transkriptionsfaktors Tec1 durch die Pheromon-induzierte MAPK-Kaskade und den TOR-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae*"