



Heidi Richter



Genetische Untersuchungen zur Funktion  
des Knospenhalsproteins **Yp1158c**  
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*





**Genetische Untersuchungen zur Funktion des  
Knospenhalsproteins Ypl158c der Hefe**  
*Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
- Biologie und Vorklinische Medizin -  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Heidi Richter**

(geb. Bolay)

aus Stuttgart

LEHRSTUHL FÜR GENETIK  
UNIVERSITÄT REGENSBURG



Juli 2008

Promotionsgesuch eingereicht am:

15. Juli 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

**Prüfungsausschuss:**

Vorsitzender:

Prof. Dr. Reinhard Wirth

Erstgutachter:

Prof. Dr. Wolfgang Seufert

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Ludwig Lehle

Dritter Prüfer:

Prof. Dr. Stephan Schneuwly

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt  
und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

---



*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,  
man muß sie für fertig erklären,  
wenn man nach Zeit und Umständen  
das Möglichste getan hat.*

(Johann Wolfgang von Goethe)



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>13</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>16</b>
<b>2 Abstract.....</b>	<b>18</b>
<b>3 Einleitung.....</b>	<b>20</b>
3.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus .....	20
3.2 Der Zellteilungszyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
3.3 Regulation des Zellzyklus .....	24
3.3.1 Regulation durch cyclinabhängige Kinasen.....	24
3.3.2 Regulation durch Kontrollsysteme .....	25
3.3.3 Regulation durch Proteindegradation .....	26
3.3.4 MEN und FEAR .....	28
3.3.5 Der Transkriptionsfaktor Swi5 .....	30
3.4 Zellwand, Zellwandintegrität, Cytokinese und Zellseparation.....	34
3.4.1 Die Zellwand .....	34
3.4.2 Die Zellwandintegrität .....	36
3.4.3 Cytokinese und Zellseparation.....	41
<b>4 Ziel der Arbeit .....</b>	<b>44</b>
<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
5.1 Ypl158c ist das Bindeglied zwischen Slf2 und Swi5 .....	45
5.1.1 Ypl158c zeigt genetische Interaktionen mit Vertretern des Zellintegritätswegs.....	45
5.1.2 Ypl158c ist in einigen Hefen konserviert .....	47
5.2 Die Lebensfähigkeit der <i>ypl158cΔ</i> Mutanten ist abhängig von einem funktionierenden Zellintegritätsweg.....	48
5.3 Defekte in der Cytokinese und Zellseparation .....	50
5.4 Ypl158c hat Einfluss auf den Zellintegritätsweg .....	52
5.5 Suppression der Phänotypen durch <i>YPL158c</i> .....	54
5.5.1 Verlangsamtes Wachstum und Thermosensitivität der Doppelmutanten wird supprimiert.....	54
5.5.2 Defekte in der Cytokinese und Zellseparation werden behoben.....	56
5.5.3 Der Zellintegritätsweg wird nicht mehr aktiviert.....	57
5.6 Weitere Phänotypen der Deletionsmutante <i>ypl158cΔ</i> .....	58
5.6.1 Die Chitinsynthese ist nicht beeinträchtigt .....	58
5.6.2 Das Aktincytoskelett lokalisiert normal.....	60

5.7	Ypl158c lokalisiert am Knospenhals.....	62
5.7.1	Keine Beeinträchtigung der Septin- und Myo1-Lokalisation in <i>ypl158cΔ</i> Deletionsmutanten .....	65
5.7.2	Lokalisation von Ypl158c in Zellseparationsmutanten.....	68
5.7.3	Keine genetischen Interaktionen mit Zellseparationsmutanten.....	70
5.8	Ypl158c in <i>swi5Δ</i> .....	73
5.8.1	Ypl158c ist in <i>swi5Δ</i> -Mutanten in verringerter Menge vorhanden.....	73
5.8.2	Ypl158c lokalisiert in <i>swi5Δ</i> nach wie vor am Knospenhals .....	74
5.9	Ypl158c im Zellzyklusverlauf.....	75
5.9.1	Ypl158c tritt zyklisch im Zellzyklus auf.....	76
5.9.2	Ypl158c im S- und Metaphase-Arrest .....	78
5.9.3	Ypl158c bei Cln2-Überexpression.....	79
5.10	Ypl158c ist instabil.....	81
5.11	Ypl158c ist an größere Strukturen gebunden .....	82
5.12	Phänotypen und Lokalisation verkürzter Ypl158c-Konstrukte .....	84
5.12.1	Lokalisation am Knospenhals .....	87
5.12.2	Eine Region von AS 98 – 606 behebt den Defekt in der Cytokinese .....	91
5.12.3	Die Ypl158c-Verkürzungen zeigen unterschiedliche Mengen in der Western-Blot- Analyse .....	93
<b>10   6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>
6.1	Swi5 beeinflusst Cytokinese und Zellseparation.....	96
6.2	Aktivierung des Zellintegritätswegs.....	97
6.3	Funktion des Knospenhalsproteins Ypl158c .....	98
6.3.1	Lokalisation .....	98
6.3.2	Physikalische Interaktionen .....	99
6.3.3	Genetische Interaktionen .....	100
6.3.4	Beteiligung von Ypl158c an einem Netzwerk der $\beta$ -Glucanmaskierung.....	101
6.3.5	Modell der Funktion von Ypl158c.....	101
<b>7</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>103</b>
7.1	Arbeiten mit Bakterien .....	103
7.1.1	Kultivierung von Bakterien .....	103
7.1.2	Herstellung elektrokompenter DH5 $\alpha$ -Zellen .....	103
7.1.3	Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation .....	103
7.2	Arbeiten mit Hefe.....	104
7.2.1	Kultivierung von Hefe .....	104
7.2.2	Konservierung von Hefestämmen.....	104
7.2.3	Kreuzung haploider Hefestämme .....	104
7.2.4	Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse .....	105
7.2.5	Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode .....	105

7.2.6	Test des Wachstumsverhaltens mittels Verdünnungsreihen .....	106
7.2.7	Synchronisation von Hefekulturen .....	106
7.2.7.1	Synchronisation durch Pheromon .....	106
7.2.7.2	Synchronisation durch Nocodazol .....	107
7.2.7.3	Synchronisation durch Hydroxyharnstoff .....	107
7.2.8	Unterbrechung der Proteinneusynthese durch Cycloheximid .....	108
7.3	Färbung und Mikroskopie von Hefezellen .....	109
7.3.1	Ethanolfixierung von Hefezellen .....	109
7.3.2	Formaldehydfixierung von Hefezellen .....	109
7.3.3	DNA-Färbung mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) .....	109
7.3.4	Färben der Zellwand mit ConA-FITC .....	109
7.3.5	Aktinfärbung .....	110
7.3.6	Calcofluorfärbung .....	110
7.3.7	Indirekte Immunfluoreszenz .....	110
7.3.7.1	Beschichtung der Multiwell Objektträger mit Polylysin .....	111
7.3.7.2	Vorbereitung der Proben für die indirekte Immunfluoreszenz .....	111
7.3.8	Mikroskopie .....	111
7.3.9	Durchflusszytometrie .....	112
7.4	Genetische und molekularbiologische Methoden .....	112
7.4.1	Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	112
7.4.1.1	Plasmidpräparation (Minilysate) nach der Kochlysatmethode .....	112
7.4.1.2	Plasmidpräparation (Minilysate) durch alkalische Lyse .....	112
7.4.1.3	Säulenreinigung von Plasmid-DNA .....	113
7.4.2	Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad einer DNA-Lösung .....	113
7.4.3	Plasmidpräparation aus Hefezellen .....	113
7.4.4	Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen .....	114
7.4.5	Gelelektrophorese von DNA .....	114
7.4.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	115
7.4.7	Restriktionsverdau von DNA .....	115
7.4.8	Behandlung mit alkalischer Phosphatase .....	115
7.4.9	Ligation .....	116
7.4.10	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	116
7.4.10.1	PCR zur Amplifikation von DNA Fragmenten .....	118
7.4.10.2	PCR zur Genommanipulation .....	119
7.4.10.3	Paarungstyp-Bestimmung mittels Kolonie-PCR .....	120
7.5	Proteinanalytische Methoden .....	121
7.5.1	Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen .....	121
7.5.2	Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation .....	121
7.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	122
7.5.4	Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen .....	123
7.6	Zwei-Hybrid-Screen .....	123

<b>8</b>	<b>Material .....</b>	<b>127</b>
8.1	Nukleinsäuren .....	127
8.2	Proteine und Enzyme .....	127
8.3	Antikörper und Seren .....	128
8.3.1	Primäre Antikörper und Seren .....	128
8.3.2	Sekundäre Antikörper .....	129
8.4	Chemikalien .....	129
8.5	Sonstige Materialien .....	132
8.6	Geräte .....	133
8.7	Medien, Puffer und Lösungen .....	136
8.7.1	Bakterienmedien .....	136
8.7.2	Hefemedien .....	136
8.7.3	Puffer und Lösungen .....	137
8.8	Oligonukleotide .....	142
8.9	Plasmide .....	145
8.10	Hefestämme .....	146
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>150</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>156</b>
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	156
10.2	Tabellenverzeichnis .....	157
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>158</b>
	<b>Danke .....</b>	<b>160</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Δ	Deletion
λ	Wellenlänge
α-	anti
α-Faktor	alpha-Faktor
β-Gal	β-Galaktosidase
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
μl	Mikroliter
<b>A</b>	
A	Ampere oder auch Absorption
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APC	engl. <i>Anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
<b>B</b>	
b	Base(n)
BD	<i>LexA</i> -DNA-Bindedomäne
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
<b>C</b>	
ca.	circa
CAK	CDK aktivierende Kinase (engl. <i>CDK activating kinases</i> )
CDK	Cyclin abhängige Kinase (engl. <i>cyclin dependent kinase</i> )
Chx	Cycloheximid
CKI	CDK Inhibitor (engl. <i>CDK inhibitor</i> )
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Ende einer Polypeptidkette
ConA	Concavalin A
<b>D</b>	
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DIC	Differential Interference Contrast
DMFA	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
<b>E</b>	
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et altera</i> )
EtOH	Ethanol
<b>F</b>	
FEAR	engl. <i>Cdc fourteen early anaphase release</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	vorwärts (engl. <i>forward</i> )

**G**

g	Gramm
G	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GDP	Guanosin-Diphosphat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GTP	Guanosin-Triphosphat

**H**

H <sub>2</sub> O	Wasser
HA	Hämagglutinin-Epitop

**I**

i.e.	das heißt (lat. <i>id est</i> )
i.d.R.	In der Regel
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G

**K**

k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton

**L**

Lat.	lateinisch
l	Liter
LB	<i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium

**M**

MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
MDa	Megadalton
MEN	engl. <i>mitotic exit network</i>
MEK	MAP-Kinase
MEKK	MAP-Kinase Kinase
MeOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i> )
Myc	c-myc-Epitop

14 |

**N**

N-Terminus	Amino-Ende einer Polypeptidkette
------------	----------------------------------

**O**

OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm
ORC	Origin Erkennungskomplex (engl. <i>origin-recognition-complex</i> )
ORF	Offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i> )

**P**

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pTEF2	Promotor des Gens <i>TEF2</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglykol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration

**R**

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rev	rückwärts (engl. <i>reverse</i> )

**S**

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF	engl. <i>Skp1-Cdc53(Cullin)-E-Box-Protein-Komplex</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SGA	engl. <i>synthetic genetic array</i>
SPB	Spindelpolkkörper (engl. <i>spindle pole body</i> )

**T**

TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
tCYC1	Terminator des Gens <i>CYC1</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

**U**

U	Units
UBC	Ubiquitin konjugierendes Enzym (engl. <i>ubiquitin conjugating enzyme</i> )
UDP	Uracil-Diphosphat
UE	Untereinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht

**V**

V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche

**W**

w/v	Masse pro Volumen
WT	Wildtyp
WB	Western-Blot

**Y**

<i>YFG</i>	engl. <i>your favourite gene</i>
------------	----------------------------------

**X**

X-Gal	(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- $\beta$ -D-galactosid
-------	---

Aminosäuren und Nukleotide werden nach den internationalen Regeln abgekürzt.

Die Schreibweise der Gene und Proteine richtet sich nach der Hefenomenklatur.

Gängige Fachausdrücke aus dem Englischen wurden übernommen, wenn eine deutsche Entsprechung nicht existiert oder nicht gebräuchlich ist.

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Wie in allen Eukaryoten ist in *Saccharomyces cerevisiae* die Cytokinese am Ende eines Zellteilungszyklus der letzte Schritt bevor sich die Zelle von ihrer Tochterzelle trennt. Dabei wird das Cytoplasma der Mutter- und Tochterzelle durch Einschnüren der Plasmamembran mit Hilfe des kontraktilen Aktin-Myosin-Ringes und dem gleichzeitigen Ausbilden eines Septums aus Chitin voneinander getrennt. Die einzige Verbindung, die nun noch zwischen den beiden Zellen besteht, das Septum, wird durch die Aktivität von Chitinasen in der Zellseparation aufgehoben. Die Zellen können daraufhin einen neuen Zellteilungszyklus beginnen. Da die Trennung der Zellen mit dem Aufbau neuer Zellmembran und Zellwand verbunden ist, darf dabei die Integrität der Zellwand nie vernachlässigt werden. An der Erhaltung der Zellintegrität sind viele Proteine beteiligt, die auf Veränderungen, die auf die Zellwand einwirken, reagieren. Diese sorgen auch dafür, dass die Zellen in der Cytokinese und Zellseparation keinen Schaden nehmen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ypl158c ein neuer Mitspieler in der Cytokinese und Zellseparation ist. Außerdem konnte eine Verbindung zum Zellintegritätsweg hergestellt werden. *YPL158c* ist ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Swi5, der den Abschluss der Mitose und des Zellzyklus fördert. War *YPL158c* deletiert, führte dies zu Störungen in der Cytokinese und Zellseparation. Diese Zellen begannen einen neuen Zellteilungszyklus und bildeten eine neue Knospe aus, obwohl die Trennung der Tochterzelle von der Mutter noch nicht abgeschlossen war. In diesen Mutanten war zusätzlich die MAP Kinase Slt2, die zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität beiträgt, konstitutiv aktiv. Genetische Interaktionen zwischen *YPL158c* und *SLT2* wiesen ebenfalls darauf hin, dass Ypl158c zur Erhaltung der Zellintegrität einen Beitrag leistet. Waren beide Gene gleichzeitig deletiert, litten die Zellen an Thermosensitivität, d.h. sie waren bei höheren Temperaturen (37 °C) in ihrem Wachstum sehr stark eingeschränkt. Die ursächliche Zellyse konnte durch Gabe eines osmotischen Stabilisators zum Medium verhindert werden. Störungen in der Zellseparation, Aktivierung der MAP Kinase Slt2, genetische Interaktionen mit *SLT2* und Thermosensitivität der Doppeldeletionsmutanten waren Ereignisse, die auch in *swi5Δ* Mutanten beobachtet werden konnten. Durch die konstitutive Expression des *YPL158c*-Gens von einem Swi5-unabhängigen Promotor konnten diese Phänotypen supprimiert werden. Das bewies, dass *YPL158c* das einzige Zielgen von Swi5 ist, das die beobachteten Phänotypen der *swi5Δ* Mutanten und die Verbindung zum Zellintegritätsweg erklären kann.

Ypl158c lokalisierte schon früh im Zellzyklus am Knospenhals, dem Ort, an dem die Cytokinese stattfindet. Dort blieb es bis die Separation der Zellen abgeschlossen war. In Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass Ypl158c ein sehr instabiles Protein ist, das in der differentiellen Zentrifugation sedimentiert werden konnte. Es scheint damit an größere Strukturen, möglicherweise Membranstrukturen zu assoziieren. Ein Synchronexperiment, das die Zellen aus einem  $\alpha$ -Faktor-Arrest wieder in den Zellzyklus entlässt, zeigte, dass Ypl158c dann verstärkt synthetisiert wurde, wenn die Zellen die Cytokinese begannen. Durch die Untersuchungen verschiedener, sowohl C-terminal als auch N-terminal verkürzter Ypl158c-Konstrukte, konnte die Region, die für die Lokalisation und Funktion des Proteins verantwortlich ist, auf die ersten 606 N-terminalen Aminosäuren eingegrenzt werden. Dabei lag das Signal, das für die Lokalisation von Ypl158c am Knospenhals notwendig ist, zwischen den Aminosäuren 433 und 606. Allein die Lokalisation des Proteins war dabei nicht hinreichend für die Funktion. Nicht alle verkürzten Konstrukte, die am Knospenhals lokalisierten, konnten die Cytokinese und Zellseparation vorantreiben. Die Lokalisation ist folglich lediglich eine notwendige Voraussetzung zur Funktion des Proteins Ypl158c.

In dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass Ypl158c ein neues Protein der Cytokinese und Zellseparation ist, das am Knospenhals lokalisiert und Einfluss auf die Erhaltung der Zellintegrität besitzt. Es ist die fehlende Verknüpfung, die den Transkriptionsfaktor Swi5 mit dem Zellintegritätsweg verbindet.

## 2 ABSTRACT

In *Saccharomyces cerevisiae*, as in all eucaryotes, cytokinesis at the end of the cell cycle is the last step of the division of a daughter cell from its mother. In this process the cytoplasm of mother and daughter is separated in two by the contraction of the actomyosin ring and the concomitant formation of a septum which is build of chitin. This last connection between mother and daughter is then resolved by the action of chitinases performing the cell separation. Cells then can enter into a new round of the cell cycle. Because cell separation is tightly connected to building new membrane and cell wall, the integrity of the cell wall must never be neglected. Many proteins are involved in maintenance of the cell wall integrity. These proteins in turn react on changes that affect the cell wall and make sure that cells are not harmed during cytokinesis and cell separation.

The protein Ypl158c is a new player in cytokinesis and cell separation. It also could be linked to the cell integrity pathway. *YPL158c* is one of the target genes of the transcription factor Swi5, that promotes the exit of mitosis and the end of the cell cycle. Deletion of *YPL158c* led to defects in cytokinesis and cell separation. These cells started a new round of the division cycle and formed a new bud even though the separation of mother and daughter cell had not been completed. Furthermore the MAP kinase Slt2, that contributes to the maintenance of the cell integrity, was constitutively active in these mutants. Genetic interactions between *YPL158c* and *SLT2* gave evidence that Ypl158c contributes to the cell integrity, too. Simultaneous deletion of both genes led to thermosensitivity, and growth was severely impaired at high temperatures (37 °C) due to cell lysis. Lysis could be prevented by adding osmotic support to the medium. Defects in cell separation, activation of the MAP kinase Slt2, genetic interactions with *SLT2* and thermosensitivity of these double deletion mutants were events, that could also be observed in *swi5Δ* mutants. Constitutive expression of *YPL158c* from a Swi5 independent promoter could suppress these phenotypes. This proved that *YPL158c* is the only target of Swi5 which can explain the observed phenotypes of *swi5Δ* mutants connected to cell integrity.

Ypl158c localized at the bud neck, the place of cytokinesis, early in cell cycle, and remained there until cell separation was completed. Western blot analysis proved Ypl158c to be an instable protein which could be sedimented in differential centrifugation. It is therefore thought to be associated to larger structures in the cell, possibly membrane structures. An experiment where cells are synchronously released into the cell cycle after an  $\alpha$ -factor block showed that Ypl158c was nearly not present in G1 phase but was heavily produced when cells

entered cytokinesis. Analysis of various Ypl158c constructs, C-terminal as well as N-terminal truncated, could delimit the area of localisation and function of the protein to the first 606 N-terminal amino acids. However, the bud neck localisation signal could be narrowed down to amino acid 433 to 606, but localisation of the protein alone was not sufficient for its function. Not all truncated proteins which localized at the bud neck could drive cytokinesis and cell separation. So localisation is just a necessary precondition for the function of the protein.

This work indicates that Ypl158c is a new protein involved in cytokinesis and cell separation, that locates to the bud neck and has an impact on the maintenance of cell integrity. It is the missing link which connects the transcription factor Swi5 to cell integrity.

## 3 EINLEITUNG

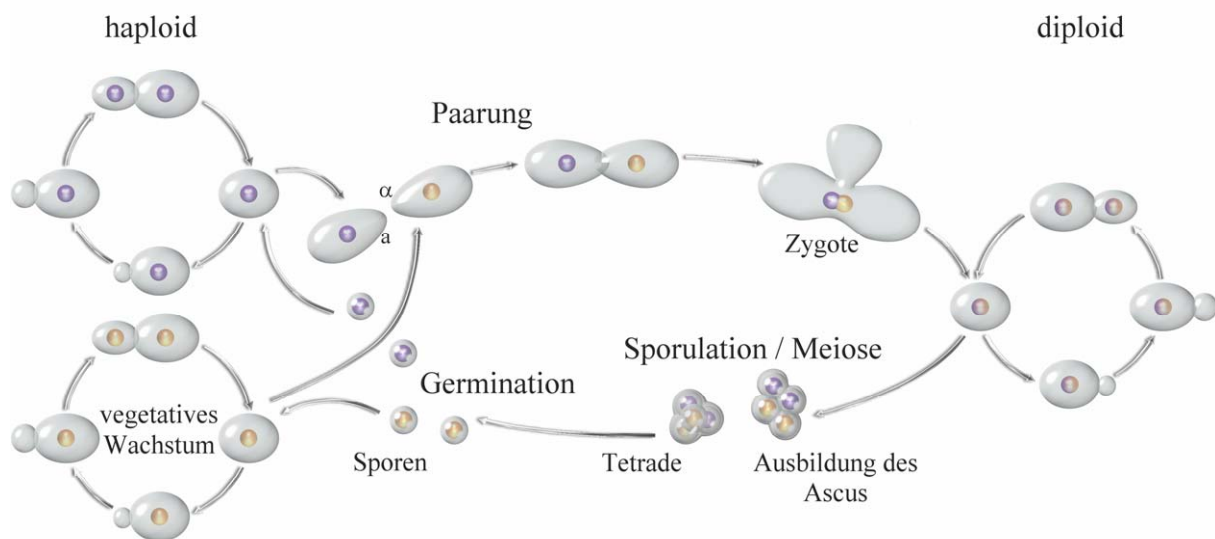
### 3.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört taxonomisch der Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze) an und ist auch bekannt unter dem Namen Bierhefe (*Saccharomyces* aus dem Altgriechischen für „Zuckerpilz“, *cerevisiae* aus dem Lateinischen für „Bier“). Als Eukaryot teilt sie viele grundlegende biologische Prozesse mit allen Eukaryoten bis hin zum Menschen. Als solcher dient sie als sehr guter Modellorganismus der modernen Genetik und Molekularbiologie. Durch Vorzüge wie Nicht-Pathogenität, einfache Kultivierung auf definierten Medien, welche dem Experimentator die Kontrolle über chemische und physikalische Bedingungen gibt und kurze Generationszeiten von ca. 90 min eignet sich dieser einzellige Organismus hervorragend als Forschungsobjekt. Die vollständige Sequenzierung (Goffeau *et al.*, 1996) des vergleichsweise kleinen Hefegenoms, das ca. 6000 Gene auf 16 Chromosomen umfasst, erweiterte das Spektrum an gut etablierten Methoden zur genetischen Manipulation, um Hefestämme mit bestimmten genetischen Eigenschaften herzustellen.

20 |

Natürlicherweise ist die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ein homothallischer diploider Organismus mit der Fähigkeit, seinen Paarungstyp zu wechseln. Die asexuelle Vermehrung findet durch Knospung statt. Dabei bildet die sogenannte Mutterzelle eine Knospe aus, die sich nach Ablauf eines mitotischen Teilungszyklus als Tochterzelle abschnürt. Im Labor werden jedoch heterothallische Stämme benötigt, die die Fähigkeit zum Paarungstypwechsel verloren haben. Haploide Stämme kommen in zwei Paarungstypen (engl. *mating type*) vor, MAT $\alpha$  und MAT $\alpha$ . Diese können stabil als haploide Stämme gehalten werden, da sie nicht mehr diploidisieren. Durch Kreuzung von Stämmen entgegengesetzten Paarungstyps und gezielte Kombination genetischer Merkmale können neue Stämme hergestellt werden. Treffen Zellen verschiedenen Paarungstyps aufeinander kommt es zur Paarung und die Zellen verschmelzen zur Zygote mit doppeltem Chromosomensatz (2N). In diesen diploiden Zellen kann dann durch Nährstoffentzug geschaffene Mangelbedingungen die Meiose eingeleitet werden. Bei der Sporulation verteilt die Hefe nach einer Reifeteilung (Verdopplung des Chromosomensatzes von 2N auf 4N) die vier Chromosomensätze durch zwei meiotische Teilungsschritte auf vier haploide Sporen. Diese bilden die Dauerform der Hefe und sind von einem Sporensack, dem Ascus umgeben (Tetrade). Die Sporen einer Tetrade können anschließend durch Mikromanipulation getrennt werden und durch nährstoffreiche

Bedingungen wieder zur Germination gebracht werden. Eine Übersicht ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Diese Methode der klassischen Genetik erlaubt, die Auswirkungen der Kombination genetischer Merkmale zu untersuchen. Durch den Einsatz geeigneter genetischer Marker und verschiedener aufeinander folgender Selektionsschritte wurde diese Methode in der SGA-Analyse (engl. *synthetic genetic array*, Tong *et al.*, 2001) für Untersuchungen im großen Maßstab angepasst. Eine weitere wichtige Methode der Genom- und Proteomanalyse, die durch die Entschlüsselung des Hefegenoms wesentlich an Bedeutung gewonnen hat, birgt das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Dabei handelt es sich um eine Technik zur Aufklärung von Protein-Protein-Interaktionen (Fields *et al.*, 1994).



**Abbildung 3.1 Lebenszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

Haploide Zellen entgegengesetzten Paarungstyps (MATa und MAT $\alpha$ ) paaren sich und bilden eine Zygote aus. Diese kann sich im vegetativen Wachstum durch Knospung vermehren. Bei Nährstoffmangel wird die Meiose und Sporenbildung ausgelöst. Die haploiden Sporen einer Tetrade können bei ausreichendem Nährstoffangebot wieder in den Zellzyklus eintreten und sich teilen. Stämme, die ihren Paarungstyp nicht wechseln können (Laborstämme) können stabil als haploide Stämme kultiviert werden. Verändert nach Morgan 2007.

### 3.2 Der Zellteilungszyklus in *Saccharomyces cerevisiae*

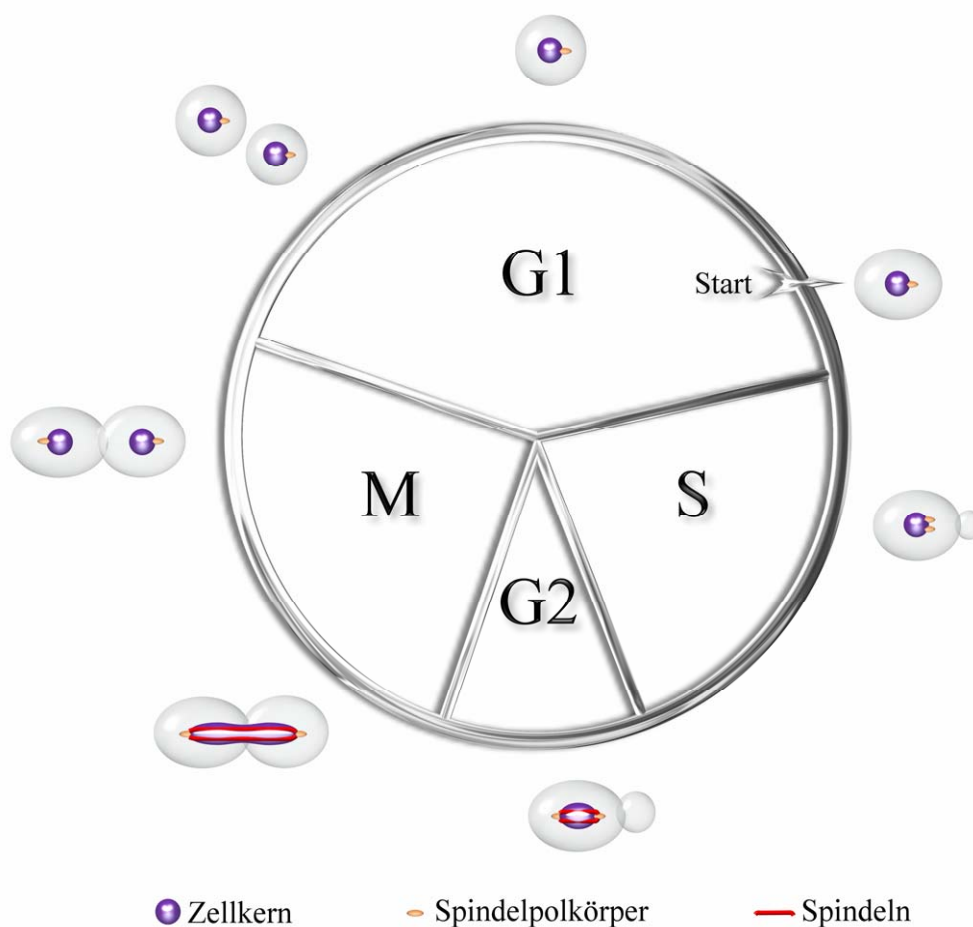
Der Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht wie bei allen Eukaryoten aus vier koordinierten Phasen (Abbildung 3.2, Übersicht in Lew *et al.*, 1997). In der S-Phase (Synthese) wird die DNA repliziert und in der Mitose (M-Phase) werden die duplizierten Chromosomen auf Mutter- und Tochterzelle verteilt. Diese beiden Phasen werden jeweils

durch eine G-Phase getrennt (engl. *gap*), G1 und G2. Der Eintritt in den Zellteilungszyklus findet in der G1-Phase statt. Die G1-Phase schließt sich an die Mitose an und gilt als Wachstumsphase. Die Zellen wachsen dabei bis zu einer kritischen Größe heran. Ist diese erreicht, treten sie in einen neuen Zellteilungszyklus ein. Dieser Übergangspunkt in den neuen Zellzyklus nennt man START. Ist dieser Punkt einmal überschritten, durchlaufen die Zellen einmal vollständig einen Teilungszyklus, auch wenn die äußeren Bedingungen sich zwischenzeitlich ändern. Außer der Zellgröße spielen auch äußere Einflüsse wie Verfügbarkeit von Nährstoffen und Anwesenheit von Paarungspheromonen eine Rolle. Bei einem Mangel an Nährstoffen durchlaufen diploide Zellen die Meiose und bilden haploide Sporen aus. Diese sind bei ausreichendem Nährstoffangebot wieder in der Lage auszukeimen. Auch haploide Zellen treten unter diesen Bedingungen nicht in einen neuen Zellzyklus ein sondern verharren in einem stationären Zustand in der G1-Phase (bis die Bedingungen sich wieder ändern). Bei Anwesenheit eines Paarungspheromons des komplementären Paarungstyps reagieren haploide Hefen, indem sie ebenfalls in der G1-Phase arretieren. Durch die Ausbildung einer Paarungsprojektion auf den Paarungspartner hin (engl. *shmoo*) ermöglichen sie eine Zell- und Kernfusion.

22 |

Mit dem Überschreiten von START beginnt der Zellzyklus. Es folgt zunächst die S-Phase, in der die DNA repliziert und die Verdopplung der Spindelpolkörper (SPB von engl. *spindle pole body*) initiiert wird. Die Spindelpolkörper sind die mikrotubuliorganisierenden Zentren der Hefe, funktionell equivalent zu den Centrosomen anderer Organismen. Sie wandern nach ihrer Verdopplung bis zum Ende der S-Phase auseinander, ordnen sich an entgegengesetzten Polen der Kernhülle an und bilden dabei eine kurze Mikrotubulispindel aus. Es beginnt auch die Ausbildung einer neuen Knospe. Noch bevor diese erkennbar wird, wird das Aktincytoskelett, bestehend aus Aktinflecken und Aktinkabeln, an der neuen Knospungsebene polarisiert. Das Aktincytoskelett leitet sekretorische Vesikel an die Zelloberfläche, an der sie fusionieren und das Wachstum polarisieren (Pruyne *et al.*, 2000a; Pruyne *et al.*, 2000b). Zu Beginn zeigt die Knospe ein apikales Wachstum, d. h. sie wächst in Längsrichtung. An diese Phase schließen sich die G2-Phase und Mitose an, in der eine Umlokalisierung der Aktinflecken auf die gesamte Zelloberfläche der Tochterzelle stattfindet. Es folgt ein isotropes, gleichzeitig in alle Richtungen ausgedehntes Wachstum. Die Mitose selbst lässt sich in weitere fünf Phasen unterteilen: Prophase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Cytokinese. In der Prophase kondensiert das Chromatin und die Mikrotubuli der Kernspindel heften sich an die Kinetochoren an. Im Gegensatz zu höheren Eukaryonten löst sich bei *Saccharomyces cerevisiae* die Kernhülle während der Mitose nicht auf. Man

spricht dabei von einer Endomitose. In der folgenden Metaphase beginnen die Schwesterchromatiden sich zu trennen. Eine Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene kann bei der Bäckerhefe ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Trennung der Kinetochore findet in der Anaphase statt. Dabei werden die Schwesterchromatiden auf die Mutter- und Tochterzelle verteilt. Die Telophase wird durch die Trennung der Kerne und das Dekondensieren der Chromosomen definiert. Die Trennung von Mutter- und Tochterzelle geschieht in der Cytokinese. Der Zellzyklus kann danach von neuem beginnen.



| 23

**Abbildung 3.2 Schema des Zellzyklus in *Saccharomyces cerevisiae***

Der Zellzyklus wird in die vier Phasen G1, S, G2 und M eingeteilt. Zu Beginn des Zellzyklus, beim Überschreiten des START-Punktes, bildet sich die Knospe aus und der Spindelpolkörper verdoppelt sich. In der S-Phase wird die DNA repliziert und die verdoppelten Spindelpolkörper wandern an entgegengesetzte Pole. Die Kernteilung und Cytokinese finden in der Mitose statt.

### 3.3 Regulation des Zellzyklus

Für einen reibungslosen Ablauf des Zellteilungszyklus ist eine strikte Regulation der einzelnen Abläufe essentiell. Diese werden durch verschiedene Regulationsmechanismen und regulatorische Proteine kontrolliert.

#### 3.3.1 Regulation durch cyclinabhängige Kinasen

Schlüsselregulatoren des eukaryotischen Zellzyklus sind die cyclinabhängigen Kinasen (CDK, engl. *cyclin dependent kinases*). CDKs sind Protein Kinasen, die bis zum Mensch hochkonserviert sind (Morgan, 1995). Sie phosphorylieren ihre Substrate überwiegend an einer S/T-P-X-K/R Konsensussequenz (Ubersax *et al.*, 2003) und werden selbst auf vielfache Weise reguliert. Zum einen findet eine Aktivierung der CDK durch Phosphorylierung (durch CAKs, engl. *CDK activating kinases*) der katalytischen Untereinheit (Thr 169 in *S. cerevisiae*) statt und zum anderen durch das Binden eines Cyclins, das für die verschiedenen Zellzyklusphasen spezifisch ist. Negative Regulation erfahren die CDKs durch die Phosphorylierung von bestimmten Aminosäure-Resten am N-Terminus (Tyr 19 in *S. cerevisiae*), die Dephosphorylierung der katalytischen Untereinheit und der Assoziation von Inhibitoren (CKIs, engl. *CDK inhibitor*) (Morgan, 1995). In *Saccharomyces cerevisiae* existieren fünf cyclinabhängige Kinasen (Cdc28, Pho85, Kin28, Ssn3 und Ctk1). Jedoch ist Cdc28 der wichtigste Regulator zentraler Ereignisse des Zellteilungszyklus. Externe Einflüsse wirken auf die Aktivität der Cdc28 Kinase und beeinflussen die Entscheidung, in einen neuen Zellzyklus einzutreten (Mendenhall *et al.*, 1998).

24 |

Cycline erhielten ihren Namen aufgrund ihres periodischen, zyklischen Auftretens im Zellzyklus (Evans *et al.*, 1983). Sie regulieren durch ihre Bindung an die CDK deren Aktivität und verleihen ihr somit ihre Spezifität. In *Saccharomyces cerevisiae* unterscheidet man zwischen den G1-Cyclinen (Cln-Cycline) und den B-Typ Cyclinen der S-Phase und Mitose (Clb-Cycline). Die G1-Cycline Cln1, Cln2 und Cln3 treten in der G1-Phase des Zellzyklus auf. Sie sind essentiell für START (Nasmyth, 1993). Cln1,2/Cdc28 steuert die Polarisierung des Cytoskeletts für die Knospenbildung, inaktiviert die Proteolyse der B-Typ Cycline, aktiviert die Proteolyse des Clb/CDK-Inhibitors Sic1 und beendet die Sensitivität der Zellen gegenüber den Paarungspheromonen (Schwob *et al.*, 1994). Dies ermöglicht den Eintritt in die S-Phase durch die Aktivierung der Clb5,6/CDKs und der DNA-Replikation (Schwob *et al.*, 1994). Cln3/Cdc28 fördert die SBF- (engl. *SCB binding factor*) und MBF- (engl. *MCB binding factor*) vermittelte Transkription der Cyclingene *CLN1* und *CLN2* (Dirick *et al.*, 1995). Da der Level an Cln3 über den Zellzyklus hinweg nicht variiert, ist Cln3 vermutlich

zusätzlich ein Sensor für die Zellgröße, welche ebenfalls für START wichtig ist (Nasmyth, 1993). Die mitotischen Cycline Clb1-4 kontrollieren die Initiation und den Ablauf der Mitose. Dabei sind sie verantwortlich für den Eintritt in die Mitose, die Bildung und Elongation der mitotischen Spindel und die Chromosomensegregation. Der Austritt aus der Mitose wird durch die Akkumulation des Clb/Cdc28-Inhibitors Sic1 und die Degradation von Clb2 und Clb3 gewährleistet.

Durch die Assoziation von CKIs werden die CDKs negativ reguliert. In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es zwei spezifische Inhibitoren, Far1 und Sic1. Far1 inhibiert spezifisch Cln/Cdc28 am START-Punkt der G1-Phase und ist das Bindeglied der Pheromonantwort mit dem Zellzyklus (Chang, 1993). Sic1 hingegen inhibiert spezifisch Clb/Cdc28 am Ende der Mitose bis zum Ende der G1-Phase und ermöglicht der Zelle zum einen den Austritt aus der Mitose und verhindert zum anderen den Beginn der S-Phase.

### 3.3.2 Regulation durch Kontrollsysteme

Die Ereignisse des Zellzyklus der meisten Organismen sind in voneinander abhängige Prozesswege eingeteilt, in denen spätere Ereignisse von der Vollendung früherer Ereignisse abhängig sind. Für die Einhaltung der Reihenfolge und der Abhängigkeit sind sogenannte Checkpoint-Mechanismen verantwortlich (Hartwell *et al.*, 1989). Ist die Vollendung eines Prozesses verzögert, wird der Zellzyklus arretiert. Die Zelle hat so die Möglichkeit, ein Zellzyklusereignis vollständig durchzuführen. Checkpoints stellen folglich eine Abhängigkeit zwischen zwei zellulären Prozessen her, die biochemisch nicht miteinander verwandt sind. Ein Checkpoint besteht im allgemeinen aus einem Sensor, der die Vollendung relevanter Prozesse überwacht und einem weiteren Protein, das das Signal vom Sensor an das Zielprotein weiterleitet (Clarke *et al.*, 2000). Im Zellzyklus existieren mehrere Checkpoints, die den geregelten Ablauf der Ereignisse gewährleisten.

Der *DNA-damage-checkpoint* stellt die Mitose in die Abhängigkeit der DNA-Synthese. Er ist ein Überwachungsmechanismus, der durch DNA-Verletzungen aktiviert wird (Longhese *et al.*, 1998). Die DNA-Schäden werden durch Reparatursysteme erkannt. Sensorkomponenten (Rad17, Rad24, Ddc1, Mec3 und Rad9) geben ihr Signal an die Checkpointkinase Mec1 weiter, die wiederum zwei weiterführende parallele Wege über Pds1 (verhindert die Trennung der Schwesterchromatiden) und Rad53 (initiiert DNA-Reparatur) aktiviert. Dies führt zu einem Arrest vor der Anaphase.

Bevor die Mitose beginnt, wird im *S-phase-checkpoint* sichergestellt, dass die DNA vollständig repliziert ist. An der DNA-Replikation beteiligte Sensorkomponenten (Dpb11, Rfc5, Pol2 und Drc1) sitzen an den Replikationsgabeln und geben, wenn notwendig, das

Signal über Mec1 wieder an Pds1 und Rad53 weiter. Auch hier kommt es zu einem Arrest vor der Anaphase.

Der *spindle-assembly-checkpoint* stellt die Anaphase in Abhängigkeit der Metaphase. Er überwacht den Prozess der bipolaren Anheftung aller Chromosomen an die Spindel und geht dabei von ungebundenen Kinetochoren aus. Bei Störungen der Mikrotubuli-Polymerisation, Defekten im Spindelpolkörper oder fehlender Anheftung der Chromosomen an die Spindel wird der Zellzyklus in der Metaphase arretiert. Die Kinase Mps1 aktiviert dabei zwei parallele Signalwege über Mad1/2/3 und Bub1/3 (verhindert Pds1 Proteolyse und somit die Trennung der Schwesterchromatiden) bzw. über Bub2 (verhindert die Proteolyse mitotischer Cycline).

### 3.3.3 Regulation durch Proteindegradation

Die räumlich und zeitlich kontrollierte Proteolyse sorgt im Zellteilungsgeschehen für einen geordneten Ablauf des Zellzyklus. Sie gewährleistet die zeitlich beschränkte Lebensdauer regulatorischer Proteine und die Aufrechterhaltung der Homöostase, während Zellstrukturen ständig erneuert werden (Baumeister *et al.*, 1998). Die Degradation ist im allgemeinen schnell, unidirektional und irreversibel. Dabei werden nur Proteine degradiert, die ein entsprechendes Abbausignal tragen. Der Mechanismus der Proteolyse spielt an drei wichtigen Punkten des Zellzyklus eine Rolle, am G1/S-Übergang, in der Mitose zur Initiation der Trennung der Schwesterchromatiden und beim Austritt aus der Mitose (King *et al.*, 1996).

26 |

Ubiquitin ist ein kleines hochkonserviertes Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht. Die Modifizierung der Proteine mit mehreren Ubiquitin-Einheiten stellt die Markierung für die kontrollierte Proteolyse durch das 26S-Proteasom dar. Für die Polyubiquitinierung wird das Ubiquitin über ein Enzymsystem, bestehend aus drei Enzymen (E1, E2, E3), an das zu degradierende Protein gebunden. Im ersten Schritt wird das Ubiquitin durch das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) aktiviert. Dies erfolgt über eine Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und dem E1-Enzym, die unter ATP-Hydrolyse geknüpft wird (Varshavsky *et al.*, 2000; Weissman, 2001). In *Saccharomyces cerevisiae* existiert nur ein E1-Enzym, Uba1. Das Ubiquitin konjugierende E2-Enzym (Ubc1-13) übernimmt das Ubiquitin und gibt es an das E3-Enzym, die Ubiquitin-Protein-Ligase ab. Diese ist für die spezifische Substraterkennung verantwortlich und knüpft das Ubiquitin über eine Isopeptidbindung an einen Lysinrest des Zielproteins (Patton *et al.*, 1998). Vorrangig existieren E3-Enzyme in Multiproteinkomplexen (Ubiquitin-Ligase-Komplexe). Diese Komplexe sind zum einen der SCF (*Skp1-Cdc53(Cullin)-F-Box-Protein-Komplex*) und zum anderen der APC (*Anaphase-Promoting-Complex*, Patton *et al.*, 1998). Beide teilen im Prinzip den gleichen Aufbau, die Substraterkennung und ihre Aktivität jedoch ist

unterschiedlich reguliert. Der SCF wird am Übergang von der G1- in die S-Phase benötigt, der APC am Übergang von der Meta- in die Anaphase.

Der SCF besteht aus einem Gerüstprotein (Cdc53), einem sogenannten F-Box-Protein, einem Adapterprotein (Skp1) und einem E2-Enzym (Cdc34). Skp1 bindet dabei einerseits an Cdc53 und andererseits die F-Box-Proteine (z.B. Cdc4, Grr1, Met30). Die F-Box-Proteine wiederum leisten die spezifische Substraterkennung. Sie bringen phosphoryliertes Substrat in engen Kontakt mit dem E2-Enzym Cdc34. Dieses ist ebenfalls über ein verbindendes RING-Finger Protein Hrt1 an das Gerüstprotein Cdc53 assoziiert (Patton *et al.*, 1998; Weissman, 2001). F-Box-Proteine interagieren über das F-Box Motiv, das aus ca. 40 Aminosäuren besteht mit Skp1 (Bai *et al.*, 1996). Zusätzlich enthalten sie substratspezifische Sequenzen, über die sie ihr Substrat erkennen und binden können. Cdc4, eines der zwei wichtigen F-Box-Proteine, erkennt sein Substrat über seine WD40 repeats (engl. für Wiederholungen, Tryptophan-Aspartat in 40 Wiederholungen) und Grr1 über seine Leucin-reiche Region (LRR). Zu den Zielproteinen des SCF<sup>Cdc4</sup> gehören Sic1 und Far1, zu denen des SCF<sup>Grr1</sup> gehören die G1-Cycline Cln1 und Cln2 (Patton *et al.*, 1998).

Der APC ist ein großer Proteinkomplex von mindestens 11 Untereinheiten, aber nur dann als Ubiquitinligase aktiv, wenn er Cdc20 oder Hct1 gebunden hat. Cdc20 und Hct1 aktivieren folglich den APC (Peters, 2002). Diese substraterkennenden Proteine erkennen ihre Substrate ebenfalls über ihre WD40 repeats. Zu den Zielproteinen des APC<sup>Cdc20</sup> gehören der Anaphaseinhibitor Pds1 und die B-Typ Cycline Clb3 und Clb5, zu denen des APC<sup>Hct1</sup> gehören Clb2 und Clb3, das Spindel-assoziierte Protein Ase1 und die Polokinase Cdc5 (Patton *et al.*, 1998). Die Ubiquitinierung der Substrate geschieht durch das E2-Enzym Ubc (engl. *ubiquitin conjugating enzyme*), welches über das RING-Finger Protein Apc11 am Gerüstprotein Apc2 assoziiert ist. Abhängig ist die Ubiquitinierung von Sequenzelementen im Substrat, der D-Box (engl. *destruction box*, Glotzer *et al.* 1991) und der KEN-Box (bezeichnet die beteiligten Aminosäuren Lysin, Glutamat, Asparagin, Pflieger *et al.* 2000).

Das 26S-Proteasom ist ein hochselektiver Proteinasekomplex, bestehend aus einem zylindrischen 20S-Kernpartikel (20S-Proteasom) und zwei 19S-Caps, die an beiden Enden des 20S-Kerns gebunden sind. Das 20S-Proteasom besteht aus vier Ringen zu jeweils sieben  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheiten, die zu einem Fass-ähnlichen Komplex assemblieren. Zugang zum aktiven Zentrum des Proteasoms haben nur entfaltete Proteine. Für das Erkennen, Entfalten und die Translokation der zu degradierenden Proteine in das Innere des Proteasoms ist die 19S-Cap-Einheit verantwortlich, die aus 18 Untereinheiten besteht. Sechs dieser Untereinheiten gehören zur Familie der AAA-ATPasen (engl. *ATPasen associated with a*

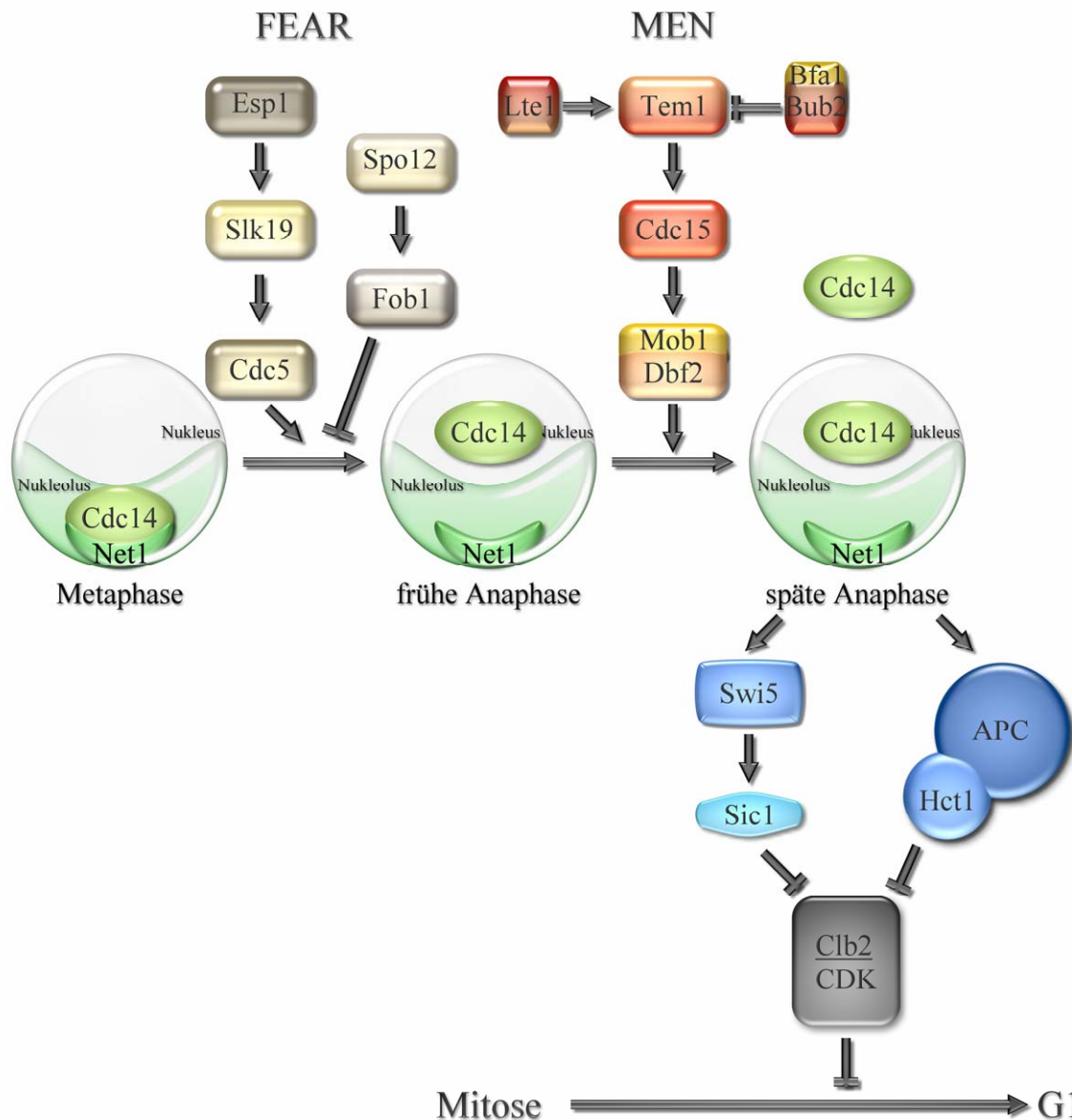
*variety of cellular activities*). Sie bilden einen Ring, der an einer oder beiden Öffnungen des 20S-Proteasoms andockt (Baumeister *et al.*, 1998).

### 3.3.4 MEN und FEAR

Der Austritt aus der Mitose wird durch die Inaktivierung der cyclinabhängigen Kinase (CDK) bewerkstelligt, die durch die konservierte Proteinphosphatase Cdc14 ausgelöst wird (Visintin *et al.*, 1998). Die Aktivität der Phosphatase Cdc14 wird durch den Inhibitor Net1 kontrolliert. Dieser hält Cdc14 während der G1-, S-, G2-Phase und der frühen Mitose (Metaphase) inaktiv im Nukleolus verankert (Bardin *et al.*, 2001). In der Anaphase wird Cdc14 in das Cytoplasma freigesetzt. Es gibt zwei Signalwege, die die Freisetzung von Cdc14 kontrollieren. Das FEAR Netzwerk (engl. *Cdc fourteen early anaphase release*) entlässt Cdc14 in der frühen Anaphase aus dem Nukleolus. Der MEN (engl. *mitotic exit network*) entlässt Cdc14 aus dem Kern und hält es während der Ana- und Telophase im freien Status (Stegmeier *et al.*, 2002). FEAR und MEN wirken unabhängig voneinander bei der Freisetzung von Cdc14 (Abbildung 3.3). Zielproteine der Phosphatase Cdc14 sind der CDK-Inhibitor Sic1, der Transkriptionsfaktor Swi5 und der Aktivator der mitotischen Cyclin Degradation Hct1 (Visintin *et al.*, 1998). Die Dephosphorylierung dieser Proteine stimuliert den Austritt aus der Mitose auf mehreren Wegen. Sic1, das durch Phosphorylierung für die Degradation markiert wurde, wird stabilisiert, der Transkriptionsfaktor Swi5 gelangt in den Kern und fördert die Transkription von *SIC1* und Hct1 assoziiert mit dem APC.

28 |

Die Separase Esp1, das Kinetochorprotein Slk19, die nukleolaren Proteine Spo12 und Fob1 und die Polokinase Cdc5 ergeben das FEAR Netzwerk (Stegmeier *et al.*, 2004; Stegmeier *et al.*, 2002). Die Protease Esp1 ist verantwortlich für die Spaltung der Kohesine zu Beginn der Anaphase. Das Kinetochorprotein Slk19 ist ebenfalls ein Zielprotein dieser Protease, dessen Rolle im FEAR allerdings unklar ist. Seine Spaltung jedenfalls ist nicht notwendig für eine frühe Freisetzung von Cdc14 (Dumitrescu *et al.*, 2002). Auch die Funktion des Spo12-Fob1 Komplexes ist noch ungeklärt. Cdc5 reguliert den Austritt aus der Mitose auf multiple Weise. Es fördert auf bisher unverstandene Weise die Aktivität von Dbf2 und aktiviert wahrscheinlich auch Bub2 und Bfa1 (Bardin *et al.*, 2001). Cdc5 ist nicht nur für die FEAR abhängige Freisetzung von Cdc14 aus dem Nukleolus essentiell, sondern auch dafür, Cdc14 in seinem freigesetzten Status zu erhalten (Stegmeier *et al.*, 2002).



**Abbildung 3.3 Modell des FEAR und MEN am Ende der Mitose**

Das FEAR-Netzwerk fördert das Freilassen der Phosphatase Cdc14 in der frühen Anaphase aus dem Nukleolus. Das MEN entlässt in der späten Anaphase Cdc14 aus dem Kern und hält es im Cytoplasma. Dort aktiviert es sowohl Swi5 als auch Hct1. Swi5 wiederum aktiviert die Transkription des CDK-Inhibitors *SIC1*. Hct1 bindet an den APC, der Clb2 zur Degradation markiert. Diese Ereignisse führen dazu, dass die Zellen die Mitose verlassen und in einen neuen Zellteilungszyklus eintreten können. Aktivierung ist durch einen spitzen Pfeil dargestellt, Inhibition durch einen stumpfen Pfeil. Verändert nach Visintin *et al.*, 2008.

Zu den Komponenten des MEN gehören eine GTPase (Tem1), mehrerer Proteinkinasen (Cdc15, Dbf2, Dbf20 und Cdc5), die Phosphatase Cdc14, der GTPase aktivierenden Komplex aus Bub1 und Bfa1 (GAP für engl. *GTPase activating protein*), der GDP-GTP Austauschfaktor Lte1 (GEF für engl. *guanine nucleotide exchange factor*) und Mob1, das mit Dbf2/Dbf20 assoziiert ist. In dieser Kaskade steht Tem1, positiv kontrolliert durch Lte1 und negativ kontrolliert durch Bub2 und Bfa1, an oberster Stelle. Es aktiviert Cdc15, das wiederum Dbf2 durch Phosphorylierung aktiviert. Tem1 lokalisiert am SBP und wandert in der Anaphase in die Tochterzelle. Lte1 jedoch lokalisiert an der Knospe, sobald diese gebildet wird. Sie sind erst im gleichen Kompartiment der Zelle, der Knospe, wenn der Kern bei der Kernteilung in die Knospe eintritt (Bardin *et al.*, 2000). Dies stellt sicher, dass der Austritt aus der Mitose erst dann erfolgt, wenn der Kern zwischen Mutter und Tochterzelle aufgeteilt ist.

### 3.3.5 Der Transkriptionsfaktor Swi5

Der Austritt aus der Mitose stellt im Zellzyklus die Verbindung zwischen der Metaphase und dem Beginn der G1-Phase her. Er wird zum Teil durch die Deaktivierung der Cyclin B CDK Aktivität kontrolliert (Toyn *et al.*, 1996). Diese Deaktivierung der Cyclin B CDK beinhaltet eine regulierte Degradation des Cyclin B (Murray *et al.*, 1989). Beim Austritt aus der Mitose spielt zusätzlich der CDK Inhibitor Sic1 eine Rolle bei der Inaktivierung der Cyclin B Kinase (Mendenhall, 1993; Toyn *et al.*, 1996). Die Degradation des Cyclins Clb2 wird durch den APC<sup>Hct1</sup> vermittelt (Patton *et al.*, 1998; Schwab *et al.*, 1997). Die inhibitorische Aktivität von Sic1 beruht auf seiner Fähigkeit, Substrate vom aktiven Zentrum der Cdc28 Kinase fernzuhalten (Mendenhall *et al.*, 1998). Hct1, Sic1 und auch der Transkriptionsfaktor Swi5 werden durch Cdc14 dephosphoryliert und aktiviert (Visintin *et al.*, 1998).

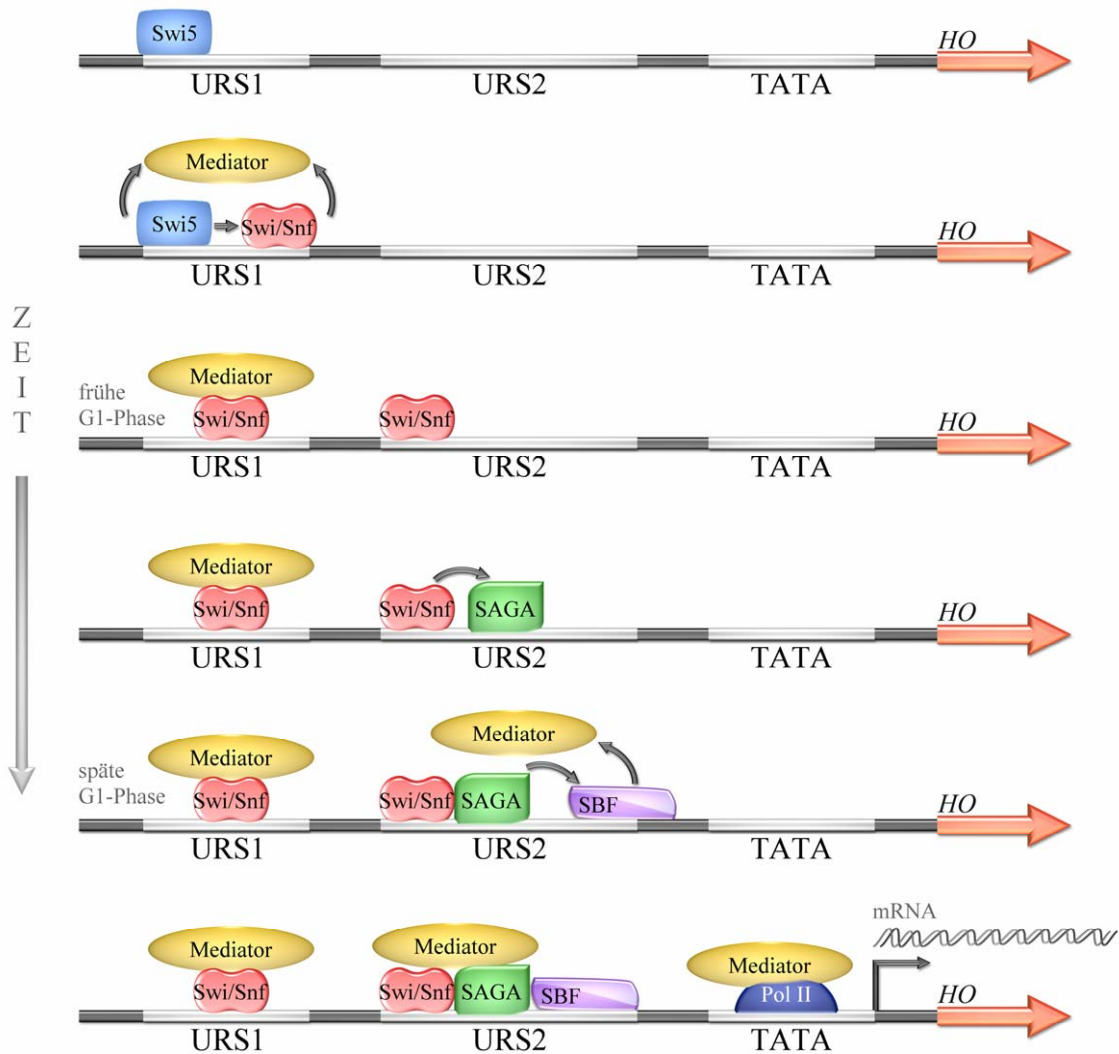
*SWI5* codiert für einen Transkriptionsfaktor mit Zinkfinger-Motiv. Das *SWI5* Gen selbst ist zellzyklusreguliert und wird nur in der zweiten Hälfte des Zellzyklus, der S, G2- und M-Phase exprimiert (Nasmyth *et al.*, 1987). In diesen Phasen verbleibt Swi5 im Cytoplasma und geht am Ende der Anaphase in den Kern (Nasmyth *et al.*, 1990). Dort aktiviert es spezifische Gene wie *HO*, *CDC6*, *RME1*, *ASH1*, *EGT2* und *SIC1*. Der Eintritt in den Kern wird durch die Phosphorylierung der Kernlokalisationssequenz verhindert und durch Dephosphorylierung derselben wieder ermöglicht (Moll *et al.*, 1991). Im Kern wird das Protein dann während der Zellseparation degradiert. Folglich ist es in der G1-Phase sehr instabil (Nasmyth *et al.*, 1990). Das *HO*-Gen (engl. *homothallic switching*) codiert für eine Doppelstrang-Endonuklease, die den Paarungstypwechsel initiiert (Kostriken *et al.*, 1983). Haploide Mutterzellen wechseln typischerweise ihren Paarungstyp, Tochterzellen jedoch nicht. Dafür verantwortlich ist ein negativer Regulator der *HO*-Expression, Ash1, der nur im Kern der Tochterzelle akkumuliert

(Amon, 1996). Bei der Knospung wird die mRNA für Ash1, dem *HO*-Repressor, spezifisch der Tochterzelle durch Myosin-getriebene Bewegung zugeteilt. Der DNA-Replikationsfaktor Cdc6 bildet zusammen mit dem ORC (engl. *Origin-Recognition-Complex*) den Pre-Replikationskomplex (Nasmyth, 1996). Er kooperiert mit Sic1 und Hct1 bei der Inaktivierung der mitotischen CDKs (Calzada *et al.*, 2001). *RME1* codiert für einen Meiose-Inhibitor, dessen Transkription in diploiden Zellen unterdrückt wird (Herskowitz, 1988). Außerdem wurden über die Jahre weitere Zielgene für Swi5 bekannt. Zu ihnen gehören die Gene der Cycline Plc9 und Plc2, die mit Pho85 assoziieren und am Ende der Mitose eine Rolle spielen (Aerne *et al.*, 1998). In einer genomweiten Analyse von Simon *et al.* 2001 wurde unter anderem untersucht, welche Gene durch Swi5 aktiviert werden. Darunter waren auch Gene, die an der Zellwandbiogenese, Knospung und Cytokinese beteiligt sind. Dazu gehören *CHS1* (Chitinsynthase), *TEC1* (Transkriptionsaktivator), *CTS1* (Endochitinase) und *CRH1* (Überexpression supprimiert Knospungsdefekte). Von den insgesamt 56 Zielgenen teilt es sich 17 mit Ace2. Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind zu 37 % identisch. Die Zinkfinger DNA-bindenden Domänen dieser Proteine sind hoch konserviert und in ihrer Aminosäuresequenz zu 83 % identisch (Dohrmann *et al.*, 1992). Obwohl sie überlappende Funktionen haben, funktionieren sie auch autonom. Auch wenn beide die Expression eines Zielgens aktivieren, ist einer von beiden der Haupteffektor (Doolin *et al.*, 2001). Beispielsweise spielt Swi5 bei der Aktivierung der Transkription von *SIC1* am Ende der Mitose die Hauptrolle und Ace2 eine Nebenrolle (Knapp *et al.*, 1996).

Nachdem Swi5 als Transkriptionsaktivator des *HO*-Gens identifiziert wurde (Stern *et al.*, 1984), ist seine Wirkungsweise an diesem Beispiel am besten untersucht. Die Initiation der *HO*-Transkription am Ende der Anaphase beginnt mit dem Eintritt von Swi5 in den Kern (Abbildung 3.4). Dort bindet es für kurze Zeit an das distale URS1 Element (engl. *upstream regulatory sequence*) des *HO*-Promotors und rekrutiert dadurch, bevor es wieder degradiert wird, den Chromatin remodellierenden Swi/Snf-Komplex (Bhoite *et al.*, 2001; Cosma *et al.*, 1999). Dieser besteht aus 12 Proteinen (Apr7, Ar9, Rtt102, Swp82, Taf14, Swi1, Swi3, Snf11, Snf12, Swi2/Snf2, Snf5, Snf6), zu denen Genprodukte der *SWI* und *SNF* Gene gehören, die namensgebend für diesen Komplex waren (Cairns *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 1994). Seine Aufgabe besteht darin, die DNA für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich zu machen (Lee *et al.*, 2004). Dies geschieht unter ATP-Verbrauch, für welchen die ATPase Swi2/Snf2 verantwortlich ist. Kurze Zeit später, wenn Swi5 degradiert ist, bindet der Swi/Snf-Komplex auch an das URS2 Element des *HO*-Promotors und rekrutiert einen weiteren Komplex, der für die Genaktivierung wichtig ist, den SAGA-Komplex (Spt-Ada-

Gcn5-Acetyltransferase). Zu diesem Komplex gehören mehrere Proteine der Spt und Ada Familie, mehrere TBP-assoziierte Proteine (TATA bindende Proteine) sowie die Acetyltransferase Gcn5. Diese acetyliert die Histone H2B und H3 der Nukleosomen. Die dadurch negativ geladenen Histone stoßen sich von der DNA ab, die Bindung zur DNA wird dadurch herabgesetzt. Kurze Zeit nach dem Binden des Transkriptionsfaktors Swi5 an das URS1 Element des *HO*-Promotors bindet auch der Mediator, zunächst an das URS1 Element, später auch an das URS2 Element und die TATA-Region (Bhoite *et al.*, 2001). Für die Rekrutierung des Mediators an *HO* sind sowohl Swi5 als auch der Swi/Snf-Komplex notwendig. Der Mediator selbst ist ein Subkomplex des RNA Polymerase II Holoenzym. Er umfasst 20 Proteine, die sich ebenfalls in weitere Subkomplexe einordnen lassen. Etwa gleichzeitig mit dem Binden des Mediators an das URS2 Element bindet dort, in der späten G1-Phase, auch der Transkriptionsfaktor SBF (bestehend aus Swi4 und Swi6). Dabei wird der SAGA Komplex für das Binden des SBF benötigt und der SBF für das Binden des Mediators. Letzen Endes binden dann der Mediator und die RNA Polymerase II zum Zeitpunkt der Transkription an die TATA-Region (Bhoite *et al.*, 2001).

32 | In Tochterzellen, die ihren Paarungstyp nicht wechseln können, ist die Situation eine andere. Zwar bindet auch hier der Transkriptionsfaktor Swi5 an das URS1 Element des *HO*-Promotors, jedoch wird die anschließende Rekrutierung des Swi/Snf-Komplexes verhindert. Mit dem Eintritt in den Kern bindet Swi5 auch an den *ASH1*-Promotor und aktiviert dessen Transkription (Bobola *et al.*, 1996). Die *ASH1* mRNA wird anschließend an der Knospenspitze verankert und dort translatiert. Das dort synthetisierte Ash1 bindet daraufhin an den *HO*-Promotor und verhindert dadurch das Rekrutieren des Swi/Snf-Komplexes durch Swi5. Hieraus resultiert, dass der Swi/Snf-Komplex nur an *HO*-Promotoren der Mutterzellchromosomen rekrutiert wird (Cosma *et al.*, 1999). Damit ist auch nur in Mutterzellen der Wechsel des Paarungstyps möglich.



**Abbildung 3.4 Modell zur Regulation der *HO*-Transkription**

Am *HO*-Promotor bindet zunächst Swi5 an das URS1 Element und rekrutiert sowohl den Swi/Snf-Komplex als auch den Mediator in der frühen G1-Phase. Swi/Snf bindet an URS2 und rekrutiert den SAGA-Komplex. Der Mediator und der SBF binden in der späten G1-Phase fast zur gleichen Zeit an URS2, wobei der SBF den SAGA-Komplex und der Mediator den SBF für das Binden benötigt. Als Letztes bindet die RNA Polymerase II und der Mediator an die TATA Region und die Transkription beginnt. Verändert nach Bhoite *et al.*, 2001.

### 3.4 Zellwand, Zellwandintegrität, Cytokinese und Zellseparation

#### 3.4.1 Die Zellwand

Die Zellwand ist ein essentielles Organell. Dies liegt unter anderem an ihrer mechanischen Stärke und damit ihrer Fähigkeit dem inneren Druck und folglich einer Lyse entgegen zu wirken (de Nobel *et al.*, 2000). Sie ist eine steife Struktur, die mechanischen Schutz bietet und die Zellform sowie die selektive Aufnahme von Makromolekülen bestimmt. Trotz ihrer scheinbaren Härte muss sie auch dynamisch sein und sich den verschiedenen Phasen eines Zellzyklus anpassen. Dazu gehören Veränderungen im Zellwandaufbau und der Zellwandstruktur bei der Bildung einer Knospe und deren Wachstum, bei der Ausbildung einer Paarungsprojektion und der Zellfusion sich paarender Zellen, bei der Septumbildung und der Zellseparation, bei der Sporenbildung und der Germination. Diese Veränderungen müssen streng überwacht und reguliert werden (Cid *et al.*, 1995). In *Saccharomyces cerevisiae* macht die Zellwand ~ 30 % des Trockengewichts der Zellen aus und besteht hauptsächlich aus Polysacchariden (~ 85 %) und Proteinen (~ 15 %) (Lesage *et al.*, 2006). Diese Polysaccharide umfassen die drei Zucker Glucose, Mannose und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) (Übersicht in Klis *et al.*, 2002). Die Glucosereste sind an andere Glucosemoleküle über  $\beta$ -1,3- oder  $\beta$ -1,6-Verknüpfungen geknüpft und über  $\beta$ -1,4-Verknüpfungen an N-Acetylglucosamin. Hauptbestandteil der Zellwand ist das Polysaccharid  $\beta$ -1,3-Glucan. Das Polysaccharid  $\beta$ -1,6-Glucan ist vergleichsweise weniger stark vertreten, spielt jedoch eine sehr wichtige Rolle bei der Quervernetzung. Mannose-Polysaccharide sind an Proteine geknüpft und bilden eine Mannoproteinhülle, die auf der äußeren Oberfläche liegt (Cabib *et al.*, 2001). Chitin ist ein lineares Polysaccharid, das aus  $\beta$ -1,4-verknüpften GlcNAc-Resten besteht. In *Saccharomyces cerevisiae* ist Chitin eine wichtige Komponente der Zellwand und des Septums (Bulik *et al.*, 2003). Die Zellwand der vegetativen Zelle ist schichtartig aufgebaut. Die innere Schicht besteht aus Glucanen und Chitin, die äußere aus Mannoproteinen. Komponenten der lateralen Zellwand finden sich auch im Septum wieder, einer spezialisierten Struktur am Knospenhals (Lesage *et al.*, 2006). Das Septum wird zwischen der Mutter- und Tochterzelle aufgebaut und erlaubt die Cytokinese am Ende der Mitose (Cid *et al.*, 1995). Es wird in drei verschiedenen Stufen aufgebaut. Die erste Stufe findet schon früh im Zellzyklus statt. Dabei wird ein Chitinring an der Basis der entstehenden Knospe gebildet. Die zweite Stufe wird bei der Cytokinese erreicht, wenn der kontraktile Aktin-Myosin-Ring zu einer Invagination der Plasmamembran führt. Dabei wird aus Chitin ein primäres Septum gebildet, das als erste Struktur die sich teilenden Zellen trennt. Wenn das

primäre Septum gebildet ist, wird im dritten und letzten Schritt, sowohl in der Mutter- als auch in der Tochterzelle, ein sekundäres Septum gebildet. Die endgültige Trennung der Zellen tritt durch die Aktivität der Chitinase ein, die das primäre Septum zum Teil hydrolysiert (Cabib *et al.*, 2001). Dabei bleibt auf der Zellwand der Mutterzelle eine Knospungsnarbe zurück und eine weniger prominente Geburtsnarbe auf der Zellwand der Tochterzelle (Lesage *et al.*, 2006).

Die Chitinsynthese wird durch Chitinsynthasen katalysiert, die GlcNAc vom Zuckerdonor UDP-GlcNAc auf eine wachsende Polysaccharidkette übertragen. Die Gene der katalytischen Untereinheiten der Chitinsynthasen CSI, CSII und CSIII sind *CHS1*, *CHS2* und *CHS3*. Sie kodieren für drei integrale Membranproteine mit sechs oder sieben vorhergesagten Transmembrandomänen (Lesage *et al.*, 2006). Chs1 scheint eine Reparaturfunktion zu übernehmen, die das Chitin des primären Septums ersetzt, das bei der Zellseparation durch die Chitinase Cts1 zu viel abgebaut wurde. Chs2 ist ausschließlich verantwortlich für den Aufbau des primären Septums. Chs3 synthetisiert den Hauptanteil des Zellwandchitins, sowohl in der Zellwand der gesamten Zelle als auch am Chitinring an der Basis der Knospe. Die Lokalisation und Aktivität von Chs3 am Knospenhals ist abhängig von der Assoziation der Chs3 Aktivatoren Skt5/Chs4 und Bni4, einem Protein, das durch das Septin Cdc10 rekrutiert wird (Lesage *et al.*, 2006). Das Gen *CTS1* kodiert für eine Endochitinase, deren Expression nur in der Tochterzelle vom Transkriptionsfaktor Ace2 aktiviert wird. Sie ist durch die Septumsdegradation an der Zellseparation beteiligt.

Noch ist unklar welche Synthesewege genommen werden, um  $\beta$ -1,6-Glucan aufzubauen. In *Saccharomyces cerevisiae* sind die Gene, die die  $\beta$ -1,6-Glucanmenge beeinflussen, im sekretorischen Syntheseweg zu finden. Die meisten dieser Gene sind nicht direkt an der  $\beta$ -1,6-Glucansynthese beteiligt, was bislang die Identifizierung von Genen, die für eine  $\beta$ -1,6-Glucansynthase kodieren verhindert hat (Lesage *et al.*, 2006).

Die Biochemie der  $\beta$ -1,3-Glucansynthase jedoch wurde eingehend studiert und die drei Komponenten dieses Komplexes identifiziert. Ein Paar eng verwandter Gene, *FKS1* und *FKS2*, kodiert für zwei alternative katalytische Untereinheiten der Glucansynthase. Es sind große integrale Membranproteine, die beide für die Glycansynthaseaktivität wichtig sind. Rho1 stellt die essentielle regulatorische Untereinheit des Komplexes dar und stimuliert die Glucansynthaseaktivität in Abhängigkeit von GTP (Levin, 2005). GTP-bindende Proteine können als molekulare Schalter fungieren, da sie aktiv sind, wenn sie GTP und inaktiv, wenn sie GDP gebunden haben. Die Umwandlung von der aktiven zur inaktiven Form wird durch GTPase aktivierende Proteine stimuliert (GAP für engl. *GTPase activating proteins*), während

die umgekehrte Umwandlung durch GTP-GDP Austauschfaktoren (GEF für engl. *guanosine nucleotide exchange factors*) vorangetrieben wird (Cabib *et al.*, 2001). Stimuliert wird Rho1 durch die redundanten Austauschfaktoren Rom1 und Rom2. Wie auch Rho1 lokalisiert Rom2 an Orten polarisierten Wachstums (Manning *et al.*, 1997). Vier GAPs aktivieren die GTPase-Aktivität von Rho1 in unterschiedlichen Zusammenhängen. Lrg1 reguliert die Glucansynthaseaktivität. Bag7 und Sac7, die sich einander sehr ähnlich sind, kontrollieren zusammen das Aktincytoskelett. Bem2 und Sac7 sind die einzigen GAPs, die den Pkc1 MAP Kinase Signalweg regulieren (Levin, 2005). Zusätzlich zur seiner Rolle als Untereinheit der  $\beta$ -1,3-Glucansynthase, spielt Rho1 auch eine kritische Rolle bei der Koordination der Zellwandorganisation und der Polarisation des Aktincytoskeletts indem es die Signalweiterleitung des Zellintegritätsweges reguliert (Lesage *et al.*, 2006).

### 3.4.2 Die Zellwandintegrität

36 |

Die scheinbar steife Struktur der Zellwand unterliegt verschiedenen Veränderungen: in den verschiedenen Phasen eines Zellzyklus, bei der Paarung und aufgrund externer Einflüsse. Um sich diesen Gegebenheiten anzupassen, sind Veränderungen im Aufbau und der Struktur der Zellwand unumgänglich. Dabei darf die Integrität der Zellwand nicht beeinträchtigt werden. In *Saccharomyces cerevisiae* überwacht der Signalweg der Zellintegrität die Veränderungen der Zellmorphologie (Abbildung 3.5). Dabei kontrolliert er die Expression von Genen, die für Enzyme des Zellwandmetabolismus kodieren. Er beteiligt sich auch an der Reorganisation des Aktincytoskeletts (Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Hohmann, 2002; Jung *et al.*, 1999). Ein entscheidendes Kriterium dieses Signalweges ist, sich schnell an die sich verändernde Umgebung anpassen zu können. Dabei bedient er sich der MAP Kinase Kaskade (engl. *mitogen activated protein*, Übersicht in Chen *et al.*, 2007). Diese Kaskade vermittelt eine Zellzyklus-regulierte Zellwandsynthese und reagiert auf verschiedene äußere Einflüsse wie Wachstumstemperatur, Nährstoffangebot, Änderungen der äußeren Osmolarität und Paarungspheromone. Auch innere Signale der G1-Cyclin/CDK beeinflussen die Signalkaskade (Gustin *et al.*, 1998). Die hauptsächliche Aufgabe dieses Signalweges besteht in der positiven Regulation des Wachstums und der Zellproliferation. Der Zellintegritätsweg umfasst eine Familie an Zelloberflächensensoren, die an das kleine G-Protein namens Rho1 gekoppelt sind, das durch die Aktivierung von Pkc1 die MAPK Kaskade stimuliert.

Die erste Komponente, die in diesem Signalweg identifiziert wurde, ist das einzige Homologe zur Proteinkinase C aus Säugern, Pkc1 (Levin *et al.*, 1990). Pkc1 besitzt eine regulatorische Domäne am N-Terminus und eine Kinase-Domäne am C-Terminus. Die Deletion von *PKC1*

ist letal. Die Zellen arretieren im Zellzyklus mit kleiner Knospe, replizierter DNA und einem Nukleus, der nahe am Knospenhals lokalisiert. Die verdoppelten Spindelpolkörper sind noch nicht getrennt und daher sind die kurzen Kernspindeln noch nicht ausgebildet (Levin *et al.*, 1990). Die Letalität kann durch den osmotischen Stabilisator Sorbitol im Medium gerettet werden. Bei der Suche nach Suppressor-Mutanten, die die Notwendigkeit der *PKC1* umgehen können, wurde die erste Komponente des MAP-Kinase Moduls, die MEKK Bck1 (MAP Kinase Kinase Kinase oder MEK Kinase, *bypass of C kinase*) identifiziert (Lee *et al.*, 1992). Bck1 besitzt in ihrer N-terminalen regulatorischen Domäne eine Phosphorylierungsstelle, die durch Pkc1 aktiviert wird. Weitere Komponenten des MAP-Kinase Moduls sind die zwei redundanten MEKs Mkk1 und Mkk2 (MAP kinase kinase, Irie *et al.* 1993) sowie die MAP-Kinase Slt2/Mpk1 (Lee *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1991). Die Deletion der einzelnen Komponenten aus dem MAP-Kinase Modul führt zu einer Temperatursensitivität durch Lyse der Zellen, die ebenfalls durch Zugabe von Sorbitol als osmotischen Stabilisator verhindert werden kann. Die nicht additiven Defekte dieser Deletionsmutanten in Kombination miteinander zeigten, dass die Proteine in einem gemeinsamen Signalweg wirken und Epistase Experimente legten die Reihenfolge der Aktivitäten fest (Irie *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993).

Im allgemeinen ist der Ablauf einer MAPK-Kaskade folgender. Eine aktivierte MEKK aktiviert die MEK, die wiederum die MAP Kinase aktiviert. Die MAP Kinase Kaskade ist somit eine Kaskade aufeinander folgender Phosphorylierungsreaktionen. MEKKs besitzen eine N-terminale regulatorische Domäne und eine C-terminale Serin/Threonin Proteinkinase Domäne. Auf Aktivierung hin phosphoryliert die MEKK zwei Serine oder Threonine an konservierten Positionen im Aktivierungs-Loop ihrer Ziel-MEK, die eine dualspezifische (Serin/Threonin und Tyrosin) Proteinkinase ist. Die aktivierte MEK phosphoryliert daraufhin die beiden Aminosäuren Threonin (manchmal Serin) und Tyrosin ihrer Ziel-MAP Kinase, die in einem konservierten Thr(Ser)-X-Tyr-Motiv im Aktivierungs-Loop liegen. Diese Phosphorylierungen aktivieren die MAP Kinase dadurch, dass sie substanzielle Konformationsänderungen hervorrufen. MAP Kinasen sind Serin/Threonin Kinasen, die ihr Substrat an einem Ser/Thr-Pro-Motiv phosphorylieren (Chen *et al.*, 2007).

Um die MAP Kinase Kaskade zu initiieren muss die MEKK aktiviert werden. Zu den Ereignissen, die letztlich eine MEKK und folglich die MAPK Kaskade aktivieren, gehören Prozesse wie das Binden von Liganden und/oder Antagonisten an Rezeptoren, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Dies führt dazu, dass aktiviertes monomeres G-Protein gebildet wird (Chen *et al.*, 2007). Im Falle des Zellintegritätsweges wird Pkc1 durch

das kleine GTP-bindende Protein Rho1 aktiviert, das homolog zu RhoA aus Säugern ist (Nonaka *et al.*, 1995). Rho1 ist aktiv, wenn es an GTP gebunden ist und inaktiv mit gebundenem GDP. Die Aktivierung wird durch die GTP-GDP Austauschfaktoren (GEF für engl. *guanosine nucleotide exchange factors*) Rom1 und Rom2 stimuliert. Inhibitoren oder GTPase aktivierende Proteine wie Bem2 und Sac7 (GAP für engl. *GTPase activating proteins*) regulieren Rho1 negativ. Neben der Regulation des Zellintegritätsweg über Pkc1 ist Rho1 die regulatorische Untereinheit der  $\beta$ -1,3-Glucansynthase und beteiligt an der Organisation des Aktin-Cytoskeletts und polarisierten Sekretion (Levin, 2005). Anders gesagt kontrolliert Rho1 die  $\beta$ -1,3-Glucansynthase auf drei verschiedene Arten, indem es seine richtige Lokalisation vermittelt, das Enzym aktiviert und durch die MAP Kinase Kaskade die Expression der Gene *FKS1* und *FKS2* der katalytischen Untereinheit des Enzyms kontrolliert (Hohmann, 2002).

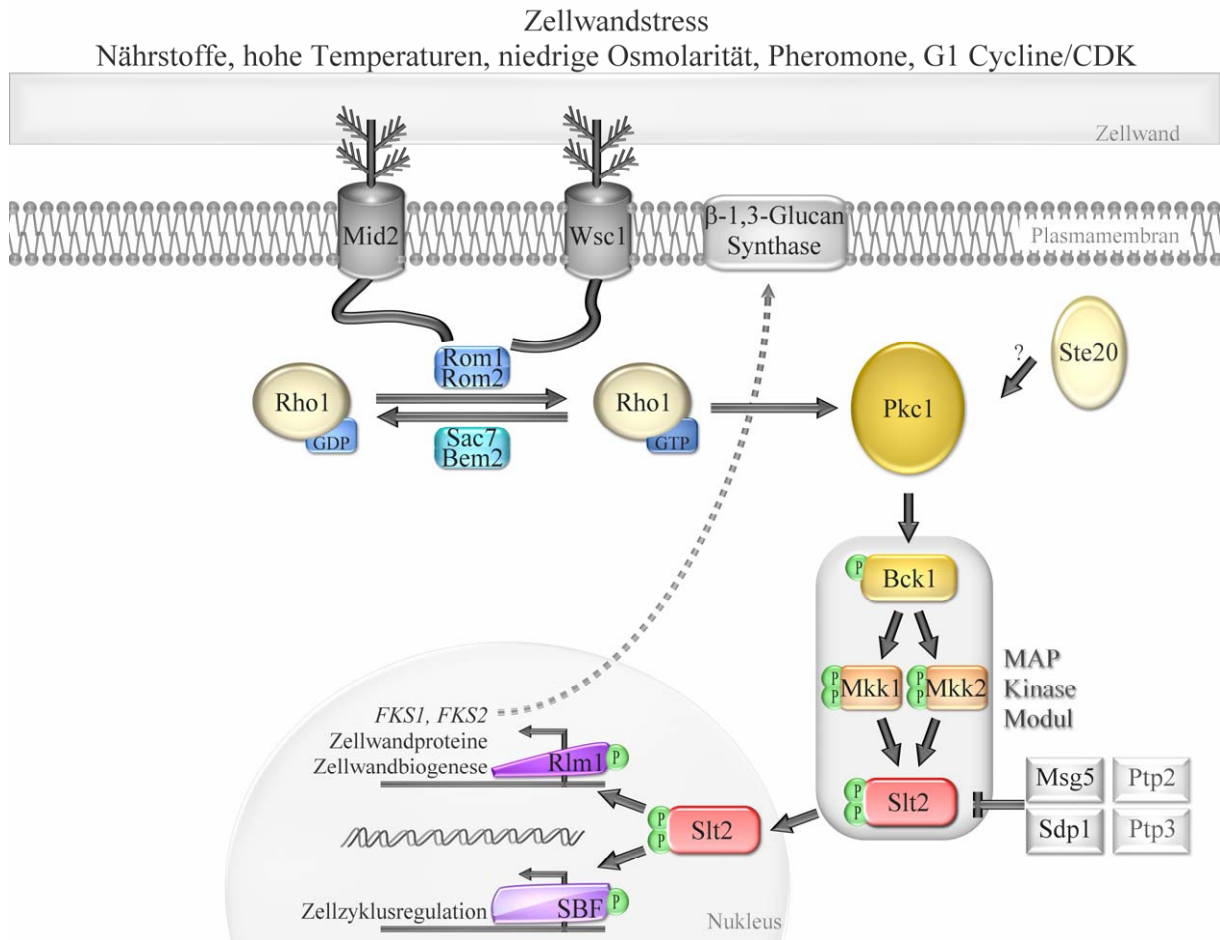
38 |

Die fünf Plasmamembranproteine (alle mit einem einzelnen Transmembransegment) Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 und Mtl1 wurden als wichtige Aktivatoren des Zellintegritätswegs identifiziert (Chen *et al.*, 2007). Sie dienen als Sensoren, die äußere Signale und Veränderungen aufnehmen und weiterleiten. Die N-terminale, extrazelluläre Domäne ist stark glycosyliert und interagiert wahrscheinlich mit der Zellwand oder ragt in sie hinein. Die Glycosylierung dieser Sensoren scheint, da sie möglicherweise für die Interaktion mit der Glucanschicht der Zellwand benötigt wird, für das Weiterleiten der Signale wichtig zu sein (Hohmann, 2002). Bei der Vielfalt an Zellwandsensoren scheinen Wsc1 und Mid2 die wichtigsten im Zellintegritätsweg zu sein. Ihre C-terminalen cytoplasmatischen Domänen interagieren mit Rom2, einem der zwei GEFs für Rho1 (Philip *et al.*, 2001). Der Mechanismus, wie diese Proteine eine Veränderung der Zellwand wahrnehmen ist noch unklar.

Am Ende einer MAP Kinase Kaskade wird eine Reihe von Substraten durch die MAP Kinase phosphoryliert. Dazu gehören Transkriptionsfaktoren, Translationsfaktoren, Proteinkinasen, Phosphatasen und andere Proteine, die den Metabolismus, die Zellmorphologie, den Zellzyklusfortschritt und die Genexpression als Reaktion auf eine Vielfalt extrazellulärer und molekularer Signale regulieren (Chen *et al.*, 2007). Momentan sind nur wenige Substrate für die MAP Kinase Slt2 bekannt. Darunter die zwei Transkriptionsfaktoren Rlm1 und der SBF (*Swi4/Swi6 binding factor*). Die hauptsächliche Transkriptionsaktivität des Zellintegritätswegs geht von Rlm1 aus. Rlm1 wird direkt von Slt2 phosphoryliert und reguliert die Expression von mindestens 25 Genen, von denen die meisten für Zellwandproteine kodieren oder anders an der Zellwandbiogenese beteiligt sind (Levin, 2005). Der SBF besteht aus zwei

Untereinheiten, dem DNA-Bindeprotein Swi4 und der regulatorischen Untereinheit Swi6. Er reguliert den Übergang der Zellen von G1 nach S (bezeichnet als START) und die Zellmorphogenese. Dabei wird er selbst vom Cln3/Cdc28 Komplex reguliert. Co-Immunpräzipitations-Experimente zeigten eine *in vivo* Interaktion von Slt2 mit dem SBF. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Swi6 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Abhängigkeit von Slt2 phosphoryliert wird (Madden *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse wiesen auf die Möglichkeit hin, dass Slt2 im Zellzyklus ebenfalls den SBF reguliert. Damit übereinstimmend fluktuiert die Aktivität der MAP Kinase im Verlauf der Zellteilung ebenfalls und ist vor allem während Phasen polarisierten Wachstums erhöht (Mazzoni *et al.*, 1993; Zarzov *et al.*, 1996). Während des Zellzyklusverlaufs ist dies der Zeitpunkt, an dem die Zellen am Ende der G1-Phase eine neue Knospe bilden. Polarisation tritt auch dann auf, wenn die Zellen Paarungspheromonen ausgesetzt sind und sich eine Paarungsprojektion ausbildet. Bei der Aktivierung von Slt2 in der Pheromonantwort ist auch Ste20 beteiligt, die MEKK aktivierende Kinase des Pheromon-MAP-Kinase-Moduls (Zarzov *et al.*, 1996). Der SBF wird daraufhin in Abhängigkeit von Slt2 aktiviert. Dies liegt daran, dass polarisiertes Wachstum auf eine einzige Stelle für die Zellen größten Stress bedeutet und für Lyse am verwundbarsten sind (Levin, 2005).

Da MAP Kinase Signalwege nur temporär aktiv sind und eine ständige Aktivierung das Wachstum der Zellen langfristig beeinträchtigen könnte, muss für eine Inaktivierung dieser Signalwege gesorgt werden. Die Aktivität der MAP Kinasen wird bei Abwesenheit der passenden Signale auf einem geringen Level gehalten. Da MAP Kinasen nur vollständig aktiv sind, wenn beide Aminosäuren Threonin und Tyrosin in ihrem Aktivierungs-Loop phosphoryliert sind, ist ein effektiver Mechanismus, MAP Kinasen zu inaktivieren, sie an einem oder beiden Resten zu dephosphorylieren (Chen *et al.*, 2007). Phosphatasen, die dies bewerkstelligen können sind entweder Protein-Tyrosin Phosphatasen, Serin/Threonin Phosphatasen oder dualspezifische (Threonin/Tyrosin) Phosphatasen. Dabei teilen sich mehrere MAP Kinase Signalwege mehrere Phosphatasen. Die Substratpräferenz jedoch wird durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten und subzelluläre Lokalisation diktiert, wobei eine Kommunikation der Signalwege durch die Phosphatasen stattfindet. Slt2 wird durch die dualspezifischen Phosphatasen Msg5 und Sdp1 und durch die Protein-Tyrosin Phosphatasen Ptp2, Ptp3 negativ reguliert.



**Abbildung 3.5 Modell des Zellintegritätswegs mit seinen wichtigsten Komponenten**

Erfährt die Zellwand Stress, wird dieses Signal durch die Sensoren Wsc1 und Mid2 an die GTPase Rho1 weitergeleitet. Diese aktiviert über Pkc1 die MAP Kinase Kaskade, deren MAP Kinase Slf2 die Transkriptionsfaktoren Rlm1 und SBF und somit die Synthese wichtiger Zellwand- und Zellwandbiogenesepoteine zur Erhaltung der Zellintegrität aktiviert. Wie Ste20 der Pheromonantwort Einfluss auf diesen Signalweg nimmt ist noch unklar. Negative Regulation erfährt Slf2 hauptsächlich durch die dualspezifischen Phosphatasen Msg5 und Sdp1. Aktivierung ist durch einen spitzen Pfeil dargestellt, Inhibition durch einen stumpfen Pfeil. Verändert nach Gustin *et al.*, 1998, Heinisch *et al.*, 1999, Hohmann 2002 und Heinisch 2005.

Msg5 wurde als Phosphatase der MAP Kinasen Fus3 und Kss1 der Pheromonantwort identifiziert (Doi *et al.*, 1994). Sie scheint jedoch eine wichtige Rolle dabei zu spielen, den basalen Phosphorylierungslevel von Slf2 gering zu halten. Für die Inaktivierung nach stressinduzierter Aktivierung ist sie jedoch nicht verantwortlich (Flandez *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2000). Ptp2 und Ptp3 hingegen sind daran beteiligt den basalen Level nach Stress (Adaptation) wieder herzustellen. Ptp2 wirkt dabei effektiver als Ptp3 (Hahn *et al.*, 2002). Auch sie dephosphorylieren nicht nur Slf2, sondern auch Fus3 der Pheromonantwort (Zhan *et al.*, 1997) und Hog1 der Antwort auf hohe Osmolaritäten (Jacoby *et al.*, 1997; Wurgler-

Murphy *et al.*, 1997). Die zweite dualspezifische Phosphatase Sdp1 dephosphoryliert Slr2 ebenfalls nach Aktivierung durch Zellwandstress (Collister *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2002). Wahrscheinlich ist sie die einzige Phosphatase, die allein für die Regulation von Slr2 verantwortlich ist.

### 3.4.3 Cytokinese und Zellseparation

Die Cytokinese und Zellseparation sind Ereignisse, die eng miteinander verknüpft sind (Abbildung 3.6, Übersichten in Bi 2001 und Yeong 2005). Dabei wirken die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes und die Bildung des Septums gemeinsam bei der Trennung von Mutter und Tochterzelle. Die endgültige Separation der Zellen wird durch das Auflösen des Septums bewerkstelligt.

An der Bildung des Aktin-Myosin-Ringes ist eine Reihe von Proteinen beteiligt. Eine tragende Rolle dabei spielen Septine. Septine umfassen eine Familie hochkonservierter GTPasen, die hauptsächlich in Hefen und Tieren vorkommen. Sie sind an mehreren Ereignissen des Zellzyklus, der Organisation des Cytoskeletts und der Um- und Neugestaltung der Membran beteiligt. Entscheidend für ihre Funktion ist dabei die Assemblierung einzelner Septine zu oligomeren Komplexen, die selbst wiederum höher geordnete Strukturen wie Filamente und Ringe bilden (Weirich *et al.*, 2008). In *Saccharomyces cerevisiae* sind die wichtigsten Septine durch Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 und Shs1 vertreten. An der vorgesehenen Knospungsstelle bilden sie schon früh im Zellzyklus einen Ring, der sich am Knospenhals im weiteren Verlauf zu einer Ringstruktur in der Form einer Sanduhr verbreitert. Während der Cytokinese spaltet sich der Ring in zwei Ringe auf, die sich auf Mutter- und Tochterzelle verteilen (Cid *et al.*, 2001; Longtine *et al.*, 2003). Dort verbleiben sie bis die Zellseparation abgeschlossen ist und markieren so die alte Teilungsstelle. Septine spielen eine Rolle in vielen verschiedenen Prozessen (Cid *et al.*, 2001; Faty *et al.*, 2002; Gladfelder *et al.*, 2001; Longtine *et al.*, 2003; Longtine *et al.*, 1996). Sie dienen unter anderem als Diffusionsbarriere, die die Verteilung von Membran und membranassoziierten Faktoren zwischen Mutter und Tochterzelle verhindert, sind an Zellzyklus-Checkpoints und an der Sekretion beteiligt (Longtine *et al.*, 2003). Hauptsächlich aber dienen Septine als Gerüst für Proteine, die bei der Wahl der Knospungsstelle (Chant *et al.*, 1995), der Cytokinese und der Zellseparation durch Chitinanlagerung beteiligt sind. Die Lokalisation und das Verweilen von Myo1 am Knospenhals ist Septin-abhängig. Die Bildung des Aktin-Myosin-Ringes ist wiederum abhängig von Myo1 (Bi, 2001).

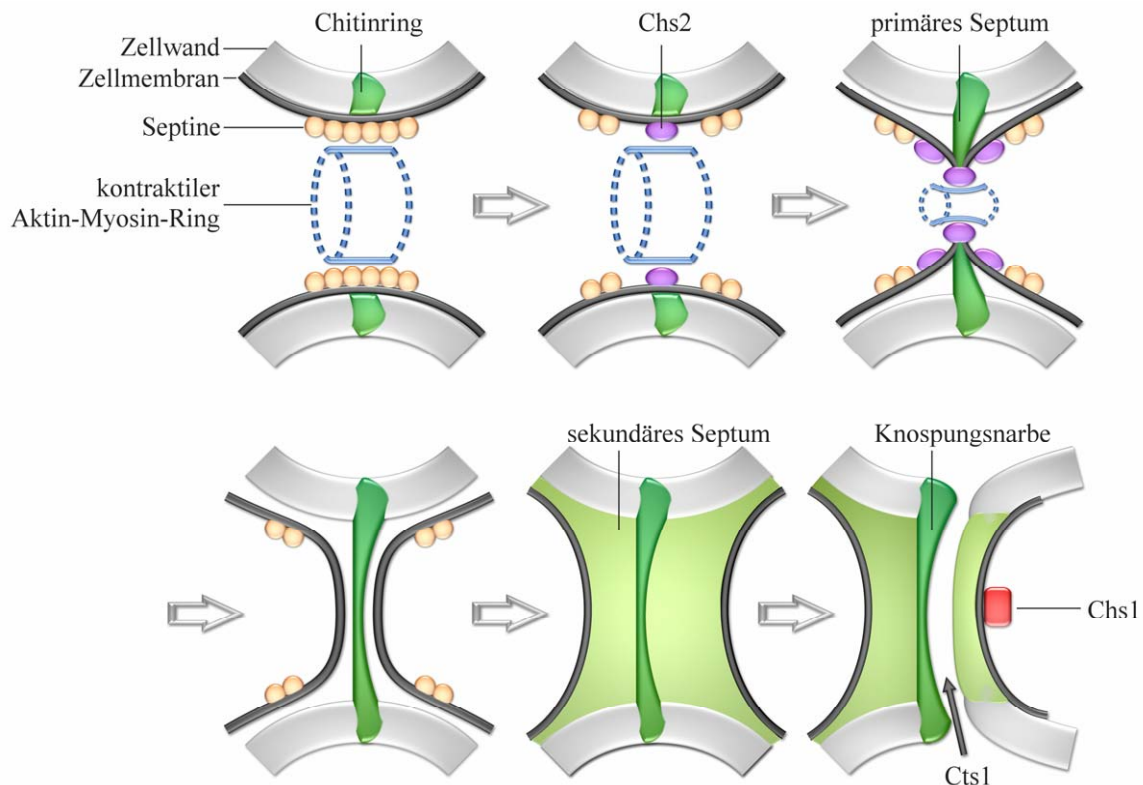
Der Aktin-Myosin-Ring ist im Gegensatz zum Septum weder für die Lebensfähigkeit der Zellen noch für die Cytokinese essentiell, wird jedoch für eine effektive Zellseparation

benötigt (Bi, 2001). Eine Abwesenheit des Aktin-Myosin-Ringes führt zu einer abnormalen Septumsausbildung (Schmidt *et al.*, 2002; Tolliday *et al.*, 2003) und einer Verzögerung der Cytokinese und Zellseparation. Die Assemblierung des Aktin-Myosin-Ringes beginnt am Anfang eines Zellzyklus in der späten G1-Phase, indem die neue Knospungsstelle durch das Typ II Myosins Myo1 markiert wird. Ist die Knospe einmal entstanden, verbleibt Myo1 an dieser Stelle, bis sich in der späten Anaphase auch F-Aktin am Knospenhals anlagert und damit einen funktionalen Aktin-Myosin-Ring bildet (Bi *et al.*, 1998). Auf die vollständige Assemblierung folgt die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes, die dadurch eine Spaltung des Cytoplasmas vorantreibt. Sie leitet die Septumbildung ein, sodass dieser Prozess effizient von statten gehen kann (Vallen *et al.*, 2000) und führt zu einer nach innen gerichteten Ablagerung von Chitin durch Chs2, wodurch das primäre Septum gebildet wird. Die Bildung des Septums wird für die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes benötigt. Beide Ereignisse müssen also koordiniert ablaufen, um eine Cytokinese durchzuführen (Bi, 2001). Zwei Proteine, Hof1 und Cyk3 scheinen bei der Koordination und dem Verbinden dieser Ereignisse eine Rolle zu spielen. Beide Proteine lokalisieren unabhängig von Myo1 und voneinander am Knospenhals. Myo1, Hof1 und Cyk3 beschreiben also drei teilweise in der Funktion überlappende Reaktionswege der Cytokinese und Zellseparation. Die Deletion eines Weges beeinträchtigt die Zellen kaum, die Deletion von zweien zur gleichen Zeit jedoch macht eine Cytokinese unmöglich und ist letal. Hof1 wird für die Aktinorganisation, die Stabilisierung des Aktin-Myosin-Ringes und die Bildung des Septums benötigt (Lippincott *et al.*, 1998a; Vallen *et al.*, 2000). Es verknüpft die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes mit der Bildung des Septums, wie auch Cyk3. Cyk3 fungiert nach der Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes in der Trennung der Zellen (Korinek *et al.*, 2000).

42 |

Die Bildung eines Septums erfordert Zellwandsynthese am Knospenhals und diese erfordert wiederum die Synthese neuer Zellmembran. Für die Chitinsynthese der Zellwand am Knospenhals ist hauptsächlich Chs2, die katalytische Untereinheit der Chitinsynthese II verantwortlich. Sie baut das primäre Septum auf, das Mutter- und Tochterzelle voneinander trennt. Chs3, die katalytische Untereinheit der Chitinsynthese III ist ebenfalls beteiligt und bildet den Chitinring an der Knospbasis. Sowohl Chs2 als auch Chs3 lokalisieren in der Telophase in Abhängigkeit von Septinen am Knospenhals (DeMarini *et al.*, 1997). Ist Chs2 depletiert, kann sich der Aktin-Myosin-Ring zwar bilden, jedoch nicht mehr kontrahieren. Ein Blockieren der Septumbildung verhindert eine Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes, nicht aber seine Bildung (Bi, 2001). Eine Cytokinese findet nicht mehr statt. Im Gegensatz dazu verhindert ein Fehlen des Aktin-Myosin-Ringes nicht die Bildung eines Septums. Die

Cytokinese kann trotzdem vollzogen werden. Ist das primäre Septum gebildet, wird das sekundäre Septum sowohl in der Mutterzelle als auch in der Knospe aufgebaut. Beide Zellen werden durch den Abbau des primären Septums voneinander getrennt. Dafür ist unter anderen die Chitinase Cts1 verantwortlich (Cabib *et al.*, 2001). Es gibt Hinweise darauf, dass auch die Proteine Eng1, Scw11 und Dse2, die Ähnlichkeit zu Glucanasen besitzen am Zellwandabbau beteiligt sind (Yeong, 2005).



**Abbildung 3.6 Modell der Cytokinese und Zellseparation**

Abgebildet sind Querschnitte durch den Knospenhals der Zelle in den letzten Schritten der Cytokinese und Zellseparation. In der Zellwand (grau) hat Chs1 bereits zu Beginn des Zellzyklus einen Ring aus Chitin abgelegt (grün). Septine (gelb) haben sich bereits unter der Zellmembran (schwarz) angelagert. Gleichzeitig mit der Kontraktion des Aktin-Myosin-Ring (blau) bildet die Chitinsynthese II (Chs2, lila) das primäre Septum (dunkelgrün) hinter der einwärts wandernden Membran aus, die schließlich fusioniert und dadurch zwei separate Zellen mit einem primären Septum dazwischen bildet. Das sekundäre Septum (hellgrün) wird sowohl in der Mutter- als auch in der Tochterzelle gebildet. Die Separation wird durch den partiellen Verdau des primären Septums durch die Chitinase Cts1 vollzogen. Die Chitinsynthese I (Chs1, rot) repariert dabei die in der Tochterzelle durch die Chitinase eventuell entstandenen Schäden in der Zellwand. Verändert nach Cabib *et al.*, 2001, Schmidt *et al.*, 2002 und Cabib 2004.

### 4 ZIEL DER ARBEIT

Swi5 ist ein Transkriptionsfaktor, der den Abschluss der Mitose und den Übergang der Zellen in die G1-Phase fördert. In einer vorangegangenen Diplomarbeit konnte Swi5 mit dem Zellintegritätsweg und der daran beteiligten MAP Kinase Slt2 in Verbindung gebracht werden (Bolay, 2003). Die Suche nach einer Verbindung zwischen Swi5 und Slt2 zeigte, dass eine solche in einem weitgehend uncharakterisierten Protein bestand, in Ypl158c. Ziel dieser Arbeit war es nun, diese Verbindung weiter zu untersuchen und die Funktion des Proteins zu beschreiben.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Ypl158c ist das Bindeglied zwischen Sl2 und Swi5

Am Ende der Mitose spielt der Transkriptionsfaktor Swi5 eine wichtige Rolle. Er fördert den Übergang des Zellzyklus von der Mitose in die G1-Phase. Als solcher ist er ein in vielerlei Hinsicht beliebtes und wichtiges Untersuchungsobjekt. Seine Regulation und Zellzyklusdynamik, die Wirkungsweise und Interaktionspartner sowie seine Zielgene sind immer wieder Gegenstand der Forschung. Im Rahmen einer Diplomarbeit sollten neue genetische Interaktionspartner von Swi5 gefunden werden, die möglicherweise eine Rolle im Ablauf der Mitose spielen (Bolay, 2003). Dabei wurde ein SGA (*synthetic genetic array*)-Screen (Tong *et al.*, 2001) mit *swi5Δ*, der Deletionsmutante des Transkriptionsfaktors Swi5 durchgeführt. Das Prinzip dieses Screens beruht auf der synthetisch genetischen Letalität, bei denen eine Mutation oder Deletion in einem Gen alleine auf die Zellen keine phänotypische Auswirkung hat, in Kombination mit einer zweiten jedoch zu Zellen führt, die in ihrem Wachstum sehr eingeschränkt oder nicht mehr lebensfähig sind (Guarente, 1993). In diesem Screen wurden, neben bereits bekannten (*dbf2Δ*, *hct1Δ*), weitere synthetisch genetische Interaktionen mit *SWI5* identifiziert. Diese wurden anschließend weiter untersucht. Eines dieser Gene, dessen Deletion in Zusammenhang mit *swi5Δ* zu einem stark verlangsamten Wachstum führte, war *SLT2*. Sl2 ist die MAP-Kinase des Zellwandintegritätsweges und spielt darin eine wichtige Rolle, wie auch die Sl2-übergeordnete MEKK Bck1 (Lee *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1996). Ein Zusammenhang zwischen dem Austritt aus der Mitose und dem Erhalt der Zellintegrität war bis dahin noch unbekannt. Die Suche in diversen Datenbanken nach einer möglichen Verbindung zwischen Swi5 und Sl2 zeigte, dass eine solche in dem bislang uncharakterisierten Protein Ypl158c besteht.

| 45

#### 5.1.1 Ypl158c zeigt genetische Interaktionen mit Vertretern des Zellintegritätswegs

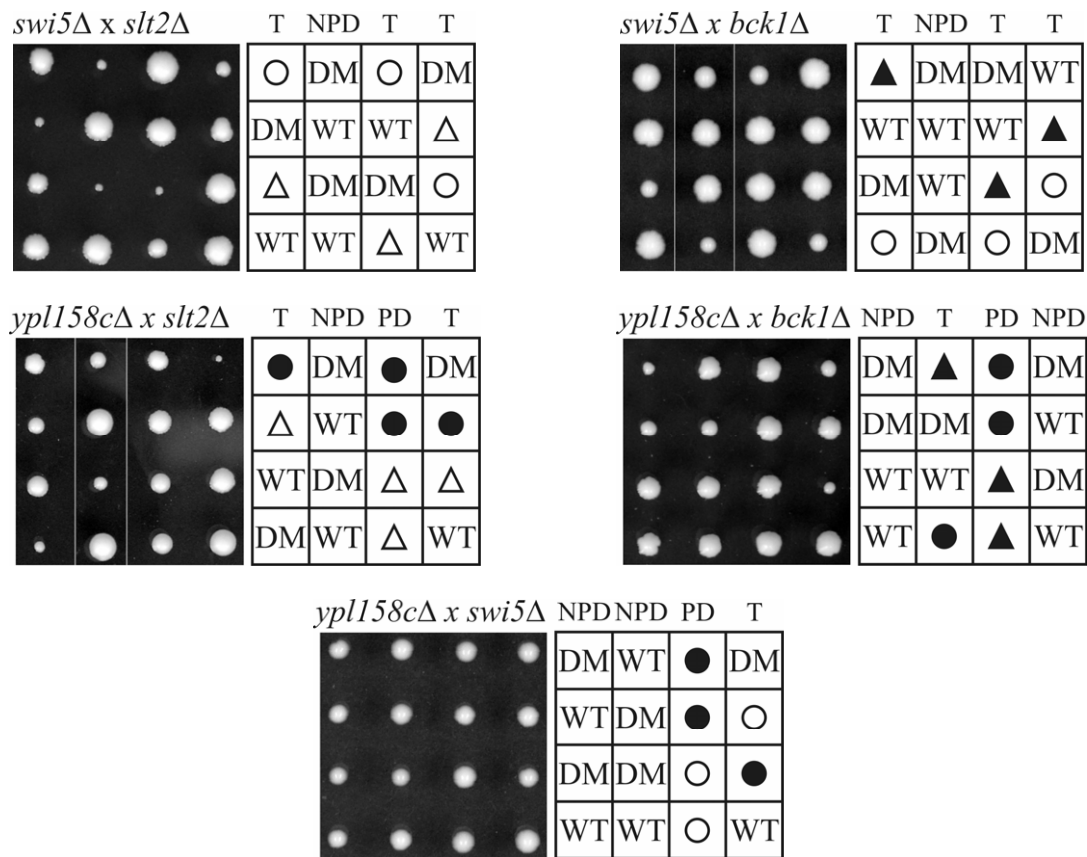
Der Transkriptionsfaktor Swi5 aktiviert die Transkription einiger Gene am M/G1-Übergang und in G1. Unter den Genprodukten findet man auch den Cyclin B/CDK Inhibitor Sic1, der am Austritt der Zellen aus der Mitose beteiligt ist (Knapp *et al.*, 1996). Transkriptionsstudien und ChIP-Analysen (Chromatin Immunpräzipitation) ermöglichten es, viele weitere Zielgene von Swi5 zu identifizieren (Doolin *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2001). Unter der Kontrolle von Swi5 stehen insgesamt 56 Gene, von denen es sich 17 mit dem Transkriptionsfaktor Ace2

teilt. Zu den Genen, deren Expression allein von Swi5 aktiviert wird gehört *YPL158c* (Doolin *et al.*, 2001; Simon *et al.*, 2001). Es besitzt in seiner Promotorregion ausschließlich drei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Swi5 (Harbison *et al.*, 2004). In einer groß angelegten Studie von Tong *et al.* 2004, die es ermöglichte ein Netzwerk von insgesamt 4000 genetischen Interaktionen zwischen 1000 Genen aufzustellen, zeigte *YPL158c* wie auch *SWI5* eine synthetisch genetische Interaktion mit *SLT2*. In diesem Screen äußerten sie sich in Letalität. Synthetisch genetische Interaktionen zwischen zwei Genen treten dann auf, wenn entweder beide Gene in einem gemeinsamen biochemischen Reaktionsweg liegen oder beide Gene in zwei getrennten, parallelen Wegen liegen. Dabei könnten beide Wege Defekte im anderen kompensieren. Die Deletion beider Wege jedoch wäre letal (Hartman *et al.*, 2001).

Um zu zeigen, dass Swi5 und Ypl158c tatsächlich in einem gemeinsamen Reaktionsweg liegen, der parallel zum Signalweg der Zellintegrität, der die MAP Kinase Sl2 und die MEKK Bck1 einschließt wirkt, wurden folgende Deletionsmutanten miteinander gekreuzt: W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) mit W4275 (*slt2Δ::natMX4*), W3736 (*swi5Δ::natMX4*) mit W6158 (*bck1Δ::kanMX4*), W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) mit W4275, W5735 (*ypl158cΔ::natMX4*) mit W6158 und schließlich W5854 mit W3736. Die diploiden Zellen wurden anschließend zur Sporulation gebracht, die sporulierten Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators getrennt und auf einer Vollmediumsplatte ausgelegt.

46 |

Wie die Abbildung 5.1 zu sehen ist, zeigten die Doppelmutanten *swi5Δ slt2Δ* und *swi5Δ bck1Δ* ein deutlich verlangsamtes Wachstum bei 30 °C. Diese genetischen Interaktionen wurden schon in der vorausgegangenen Diplomarbeit gezeigt und konnten hier bestätigt werden. Ein stark eingeschränktes Wachstumsverhalten zeigten auch die Doppelmutanten *ypl158cΔ slt2Δ* und *ypl158cΔ bck1Δ*. Die Doppelmutanten bildeten auch hier, verglichen zu den Einzelmutanten und dem Wildtyp, bei 30 °C nur kleine Kolonien aus. Wie bei Genen, die in einem gemeinsamen Reaktionsweg liegen zu erwarten war, zeigten die Doppelmutanten der Kreuzung *swi5Δ* mit *ypl158cΔ* normales Wachstum. Hier lagen keine genetischen Interaktionen vor. Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass Ypl158c zusammen mit seinem Transkriptionsfaktor Swi5 in einem gemeinsamen Reaktionsweg parallel zum Signalweg der Zellintegrität wirkt.



**Abbildung 5.1 Genetische Interaktionen von SWI5 und YPL158c mit SLT2 und BCK1**

Folgende Stämme wurden miteinander gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht: W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) mit W4275 (*slt2Δ::natMX4*), W3736 (*swi5Δ::natMX4*) mit W6158 (*bck1Δ::kanMX4*), W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) mit W4275, W5735 (*ypl158cΔ::natMX4*) mit W6158 und W3736 mit W5854. Die Sporen wurden auf XYD Platten ausgelegt und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und aufgeschlüsselt. (WT) Wildtyp, (DM) Doppelmutante, (○) *swi5Δ*, (●) *ypl158cΔ*, (△) *slt2Δ*, (▲) *bck1Δ*. Die genetischen Verteilungsmuster sind wie folgt bezeichnet: (T) Tetratyp, (PD) parentaler Dityp, (NPD) nicht-parentaler Dityp.

### 5.1.2 Ypl158c ist in einigen Hefen konserviert

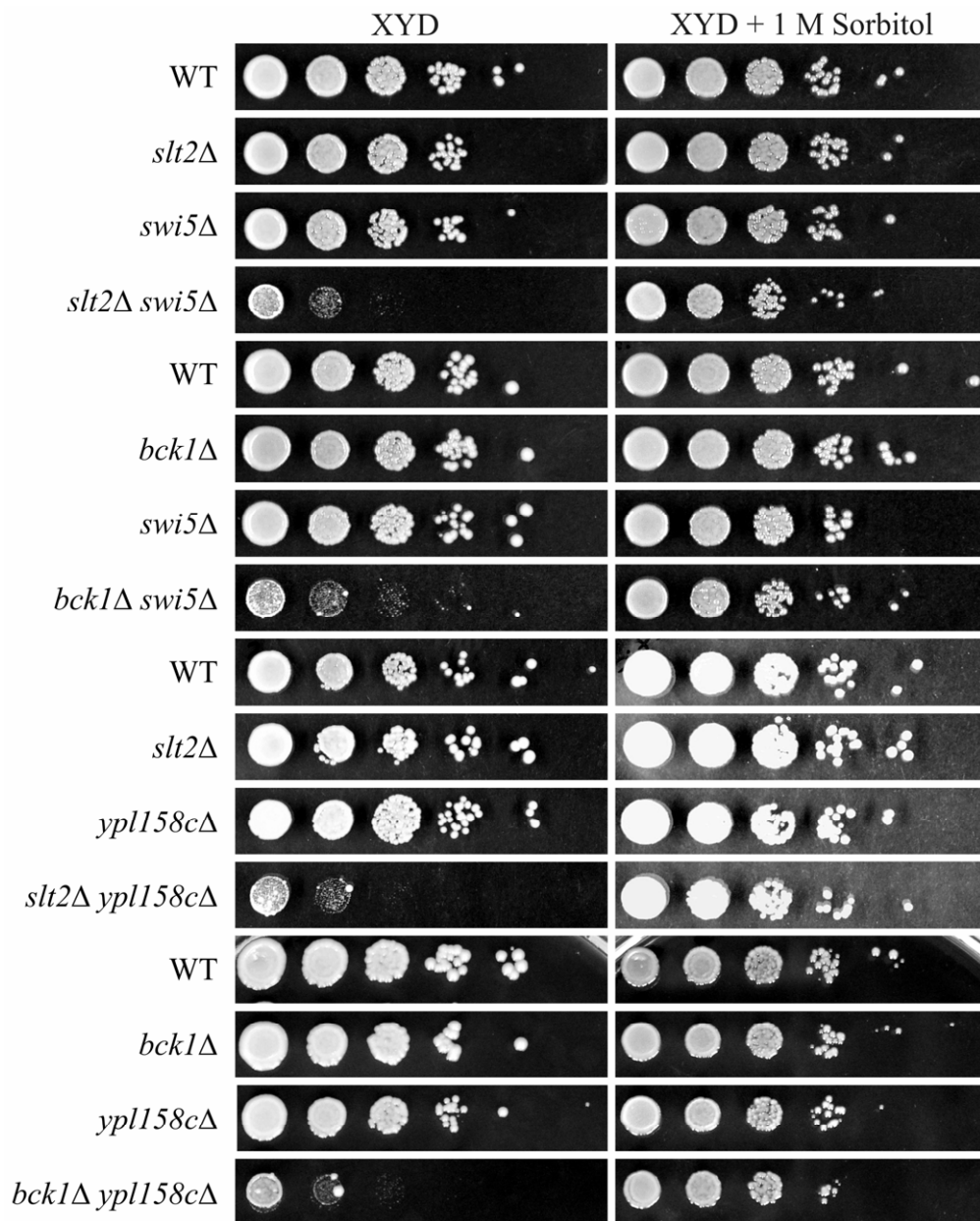
Das Protein Ypl158c aus *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus 758 Aminosäuren und hat eine Größe von 84,8 kDa. Es ist in einigen Hefen der Ordnung *Saccharomycetales* konserviert. Der Sequenzvergleich mit ausgewählten Vertretern dieser Ordnung - zu diesen gehören weitere Hefen der Gattung *Saccharomyces* (z.B. *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. mikatae*) sowie Vertreter der Gattungen *Eremothecium* (*Ashbya gossypii*), *Kluyveromyces* (*Kluyveromyces lactis*) und *Candida* (*Candida glabrata*), jedoch nicht die Gattung *Pichia* - zeigt über die gesamte Sequenz hinweg stark konservierte Aminosäurereste (Abbildung 5.24).

## 5.2 Die Lebensfähigkeit der *ypl158cΔ* Mutanten ist abhängig von einem funktionierenden Zellintegritätsweg

Es ist bekannt, dass *Slr2* als MAP-Kinase und *Bck1* als übergeordnete MEKK eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Zellintegrität spielen und somit auch beim Erlangen von Thermotoleranz gegenüber höheren Temperaturen (de Nobel *et al.*, 2000). Eine Störung im Zellintegritätsweg durch die Deletion einer der beteiligten Komponenten führt zu Thermosensitivität (Irie *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1992). Die Thermosensitivität und die damit verbundene Zellyse kann durch Zugabe von 1 M Sorbitol zur osmotischen Stabilisierung unterdrückt werden (Cid *et al.*, 1995; Irie *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1996).

Um die genetischen Interaktion zwischen *SWI5* und *YPL158c* mit *SLT2* und *BCK1* genauer zu betrachten, wurden die Nachkommen aus den vorangegangenen Kreuzungen einem Wachstumstest bei erhöhter Temperatur unterzogen. Dabei wurden die Doppelmutanten zum Vergleich mit den Einzelmutanten und dem Wildtyp in Verdünnungsreihen auf XYD-Medium gespottet und zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Um zusätzlich die Frage zu beantworten, ob die Wachstumsdefekte im Verlust der Zellintegrität begründet liegen, wurden 48 | die Zellen auch auf XYD-Medium gespottet, das 1 M Sorbitol enthielt und ebenfalls zwei Tage bei 37 °C inkubiert.

Im Vergleich zu den Einzelmutanten und dem Wildtyp zeigte sich bei den Doppelmutanten *swi5Δ slt2Δ*, *swi5Δ bck1Δ*, *ypl158cΔ slt2Δ* und *ypl158cΔ bck1Δ* ein deutlich verschlechtertes Wachstum bei 37 °C (Abbildung 5.2). Diese durch erhöhte Temperatur bedingte Lyse der Zellen wurde durch den Zusatz des osmotischen Stabilisators Sorbitol im Medium unterdrückt. Die Doppelmutanten wuchsen wieder wie der Wildtyp. Dies bedeutete, dass die Deletionsmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* einen funktionierenden Zellintegritätsweg benötigen, um lebensfähig zu sein. Ohne diesen sind die Mutationen bei höheren Temperaturen nahezu letal.



**Abbildung 5.2 Wachstumstest bei 37 °C zeigt die Notwendigkeit des Zellintegritätsweges**

Für den Wachstumstest wurden jeweils vier haploide Nachkommen aus einer Tetrade mit Tetratyp ausgewählt. Die Nachkommen stammen aus den Kreuzungen W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) mit W4275 (*slt2Δ::natMX4*), W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) mit W4275, W3736 (*swi5Δ::natMX4*) mit W5854, W3736 mit W6158 (*bck1Δ::kanMX4*) und W5735 (*ypl158cΔ::natMX4*) mit W6158 aus Abbildung 5.1. Sie wurden in Verdünnungsreihen auf XYD-Medium und auf XYD-Medium + 1 M Sorbitol gespottet und 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

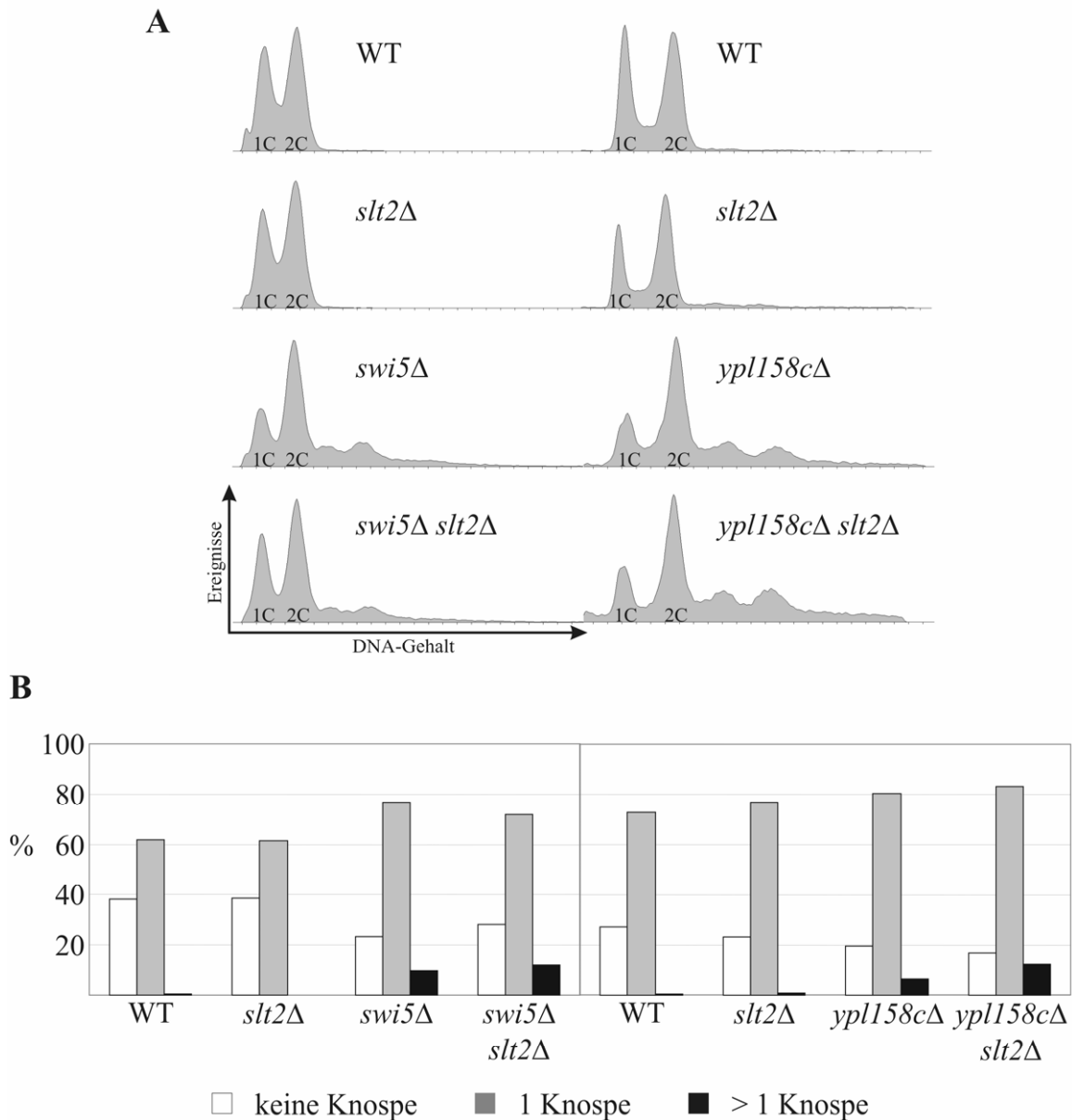
### 5.3 Defekte in der Cytokinese und Zellseparation

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, was das Wachstum der Doppelmutanten *swi5Δ slt2Δ* und *ypl158cΔ slt2Δ* so stark beeinträchtigt, wurden diese in der Durchflusszytometrie untersucht. Dabei wurde der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt. Dieser gibt Aufschluss darüber, wie die Zellen im Zellzyklus über die verschiedenen Stadien verteilt sind.

Die Einzelmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* zeigten bei dieser Untersuchung einen zusätzlichen DNA-Gehalt, der größer war als der eines verdoppelten Chromosomensatzes (Abbildung 5.3 A). Dies ließ vermuten, dass einige Zellen nach Verdopplung und Aufteilung ihrer DNA sich am Ende des Zellzyklus nicht getrennt hatten. In diesen Zellen war die Cytokinese und Zellseparation nicht abgeschlossen. Morphologisch wurde dies am Mikroskop untersucht und dabei der Knospungsindex bestimmt (Abbildung 5.3 B). Die Vermutung eines Defekts in der Cytokinese und Zellseparation konnte hier bestätigt werden. Die Einzelmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* zeigten einen deutlichen Anteil an Zellen, die mehr als eine Knospe aufwiesen, also keine Cytokinese und Zellseparation durchgeführt hatten (in *ypl158cΔ* 6,6 % und in *swi5Δ* 9,6 % der Zellen). Dieser Effekt wurde durch eine zusätzliche Deletion von *SLT2* verstärkt (*ypl158cΔ slt2Δ* 12,6 % und *swi5Δ slt2Δ* 12,1 %). Der DNA-Gehalt der Zellen ging dabei jedoch nicht über den des vierfachen Chromosomensatzes hinaus.

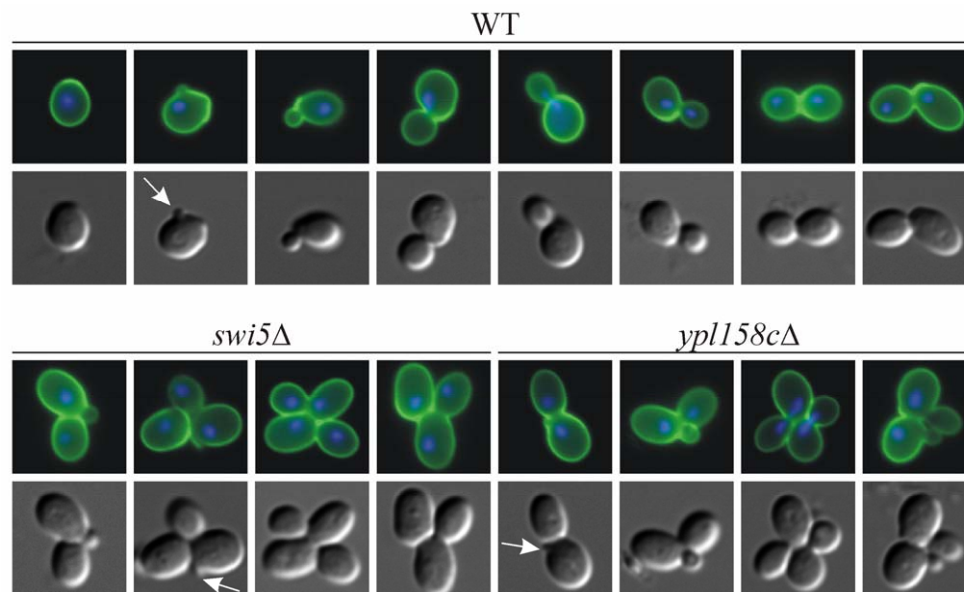
Sehr anschaulich wurde dies in einer Färbung der Zellen mit ConA-FITC, bei dem die Zellwand der Zellen durch an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppeltes Concanavalin A sichtbar gemacht wurde (Abbildung 5.4). Auch hier wurde deutlich, dass die Deletionsmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* bereits eine neue Knospe gebildet und damit einen neuen Zellzyklus begonnen hatten, obwohl die Cytokinese und Zellseparation noch nicht vollendet wurde. Dabei waren maximal vier Zellkörper zu beobachten, die keine Trennung erfahren hatten.

Die Ergebnisse der Durchflußzytometrie und der ConA-FITC Färbung zeigen, dass die Deletion von *SWI5* oder *YPL158c* einen Defekt in der Cytokinese und Zellseparation verursachen, der durch eine weitere Deletion von *SLT2* noch verstärkt wird. Diese Defekte scheinen den Prozess der Cytokinese und Zellseparation zu verlangsamen und nicht gänzlich einzustellen, da keine Zellaggregate von mehr als vier Zellkörpern zu beobachten waren.



**Abbildung 5.3 Durchflusszytometrie und Knospungsindex zeigen Defekte in der Cytokinese und Zellseparation**

Für die Durchflusszytometrie **A**) und die Bestimmung des Knospungsindex **B**) wurden jeweils vier haploiden Nachkommen aus einer Tetrade mit Tetratyp ausgewählt. Die Nachkommen stammen aus den Kreuzungen W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) mit W4275 (*slt2Δ::natMX4*), W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) mit W4275, W3736 (*swi5Δ::natMX4*) mit W5854, W3736 mit W6158 (*bck1Δ::kanMX4*) und W5735 (*ypl158cΔ::natMX4*) mit W6158 aus Abbildung 5.1. Dazu wurden die einzelnen Nachkommen bei 25°C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA für die Durchflusszytometrie erfolgte mit Sytox Green.



**Abbildung 5.4 ConA-FITC Färbung der Deletionsmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* zeigt Defekte in der Cytokinese und Zellseparation**

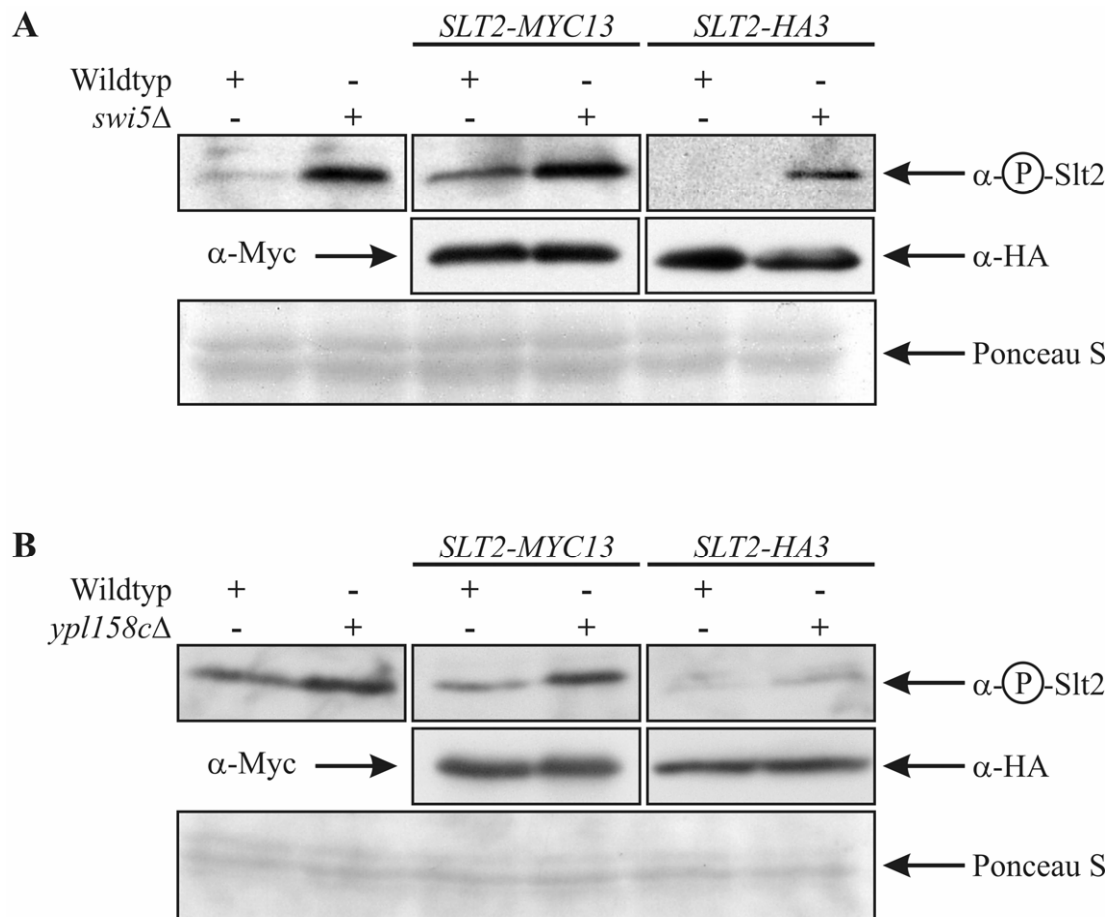
Für die ConA-FITC Färbung wurden die Stämme BY4741 (Wildtyp), W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) und W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) bei 25°C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert.

52 |

## 5.4 Ypl158c hat Einfluss auf den Zellintegritätsweg

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Zellen, die eine Deletion von *SWI5* oder *YPL158c* tragen, einen funktionellen Zellintegritätsweg für ihre Lebensfähigkeit bei höheren Temperaturen benötigen. Ein aktivierter Zellintegritätsweg beinhaltet eine Aktivierung der einzelnen beteiligten Komponenten des MAP Kinase Moduls und damit auch der MAP-Kinase Sl2 durch Phosphorylierung (Lee *et al.*, 1993). Dies wurde im folgenden Experiment ausgenutzt, um zu zeigen, dass Ypl158c und Swi5 Einfluss auf die Aktivierung des Zellintegritätsweges haben. Dazu wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch nur die zweifach phosphorylierte, aktive Form von Sl2 erkennt.

In der Western-Blot-Analyse der Stämme BY4741 (Wildtyp), W3736 (*swi5Δ::natMX4*), W4274 (*SLT2-MYC13-His3MX6*), W4459 (*SLT2-MYC13-His3MX6 swi5Δ::natMX4*), W4335 (*SLT2-HA3-His3MX6*), W4460 (*SLT2-HA3-His3MX6 swi5Δ::natMX4*), W4956 (*ypl158cΔ::kanMX4*), W4974 (*SLT2-MYC13-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX6*) und W4976 (*SLT2-HA3-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX4*) konnte gezeigt werden, dass der Anteil an aktivem,



**Abbildung 5.5 Die Phosphorylierung von Slt2 und Aktivierung des Zellintegritätsweg ist in den Deletionsstämmen *swi5Δ* und *ypl158cΔ* erhöht**

Für die Überprüfung der Phosphorylierung von Slt2 in **A**) *swi5Δ* und **B**) *ypl158cΔ* wurden die Stämme BY4741 (Wildtyp), W3736 (*swi5Δ::natMX4*), W4274 (*SLT2-MYC13-His3MX6*), W4459 (*SLT2-MYC13-His3MX6 swi5Δ::natMX4*), W4335 (*SLT2-HA3-His3MX6*), W4460 (*SLT2-HA3-His3MX6 swi5Δ::natMX4*), W4956 (*ypl158cΔ::kanMX4*), W4974 (*SLT2-MYC13-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX6*) und W4976 (*SLT2-HA3-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX4*) bei 25 °C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. In der Western-Blot-Analyse wurde phosphoryliertes Slt2 mit spezifischem polyklonalem Kaninchenantikörper, Slt2-Myc13 mit 9E10 und Slt2-HA3 mit 12CA5 nachgewiesen. Eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S sicher gestellt.

phosphoryliertem Slt2 in *swi5Δ* und *ypl158cΔ* Mutanten, verglichen mit dem in Wildtyp, deutlich erhöht war (Abbildung 5.5). Als Kontrolle dienten dabei mit Myc13 und HA3 epitopmarkierte Formen von Slt2, die zeigten, dass der erhöhte Anteil an phosphoryliertem Slt2 nicht von einer Gesamtmengezunahme von Slt2 herrührte. Das zeigte auch die Färbung der Membran mit Ponceau S, die als allgemeine Ladekontrolle diente. In den Deletionsmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* fand eine deutliche Aktivierung des

Zellintegritätsweges statt, die durch eine erhöhte Phosphorylierung der MAP-Kinase Slt2 sichtbar gemacht wurde.

## 5.5 Suppression der Phänotypen durch *YPL158c*

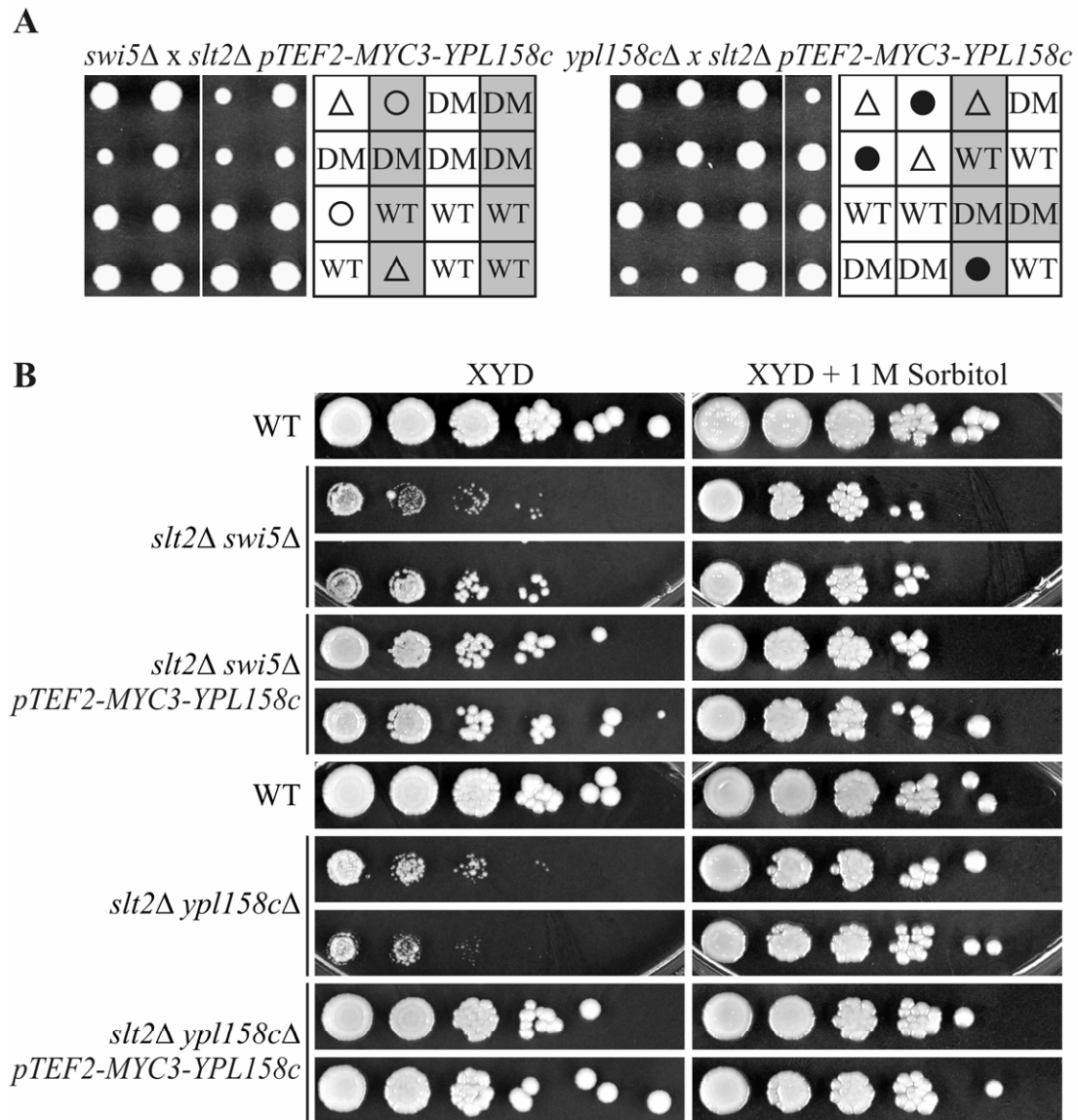
Die vorangegangenen Beobachtungen lassen die Hypothese zu, dass Swi5 und Ypl158c in einem gemeinsamen Reaktionsweg parallel zum Zellintegritätsweg agieren. Da Swi5 als Transkriptionsfaktor die Expression vieler Gene aktiviert, stellte sich die Frage, ob Ypl158c tatsächlich alleine für die verursachten Phänotypen verantwortlich ist. Ist *YPL158c* das einzige Zielgen von Swi5, das für eine funktionierende Zellintegrität benötigt wird? Sollte dies der Fall sein, würde eine Swi5-unabhängige Expression des Gens *YPL158c* die zuvor beobachteten Phänotypen supprimieren.

### 5.5.1 Verlangsamtes Wachstum und Thermosensitivität der Doppelmutanten wird supprimiert

54 |

Um diese Frage zu beantworten, wurde *YPL158c* unter die Kontrolle eines Swi5-unabhängigen konstitutiv exprimierenden Promotors gestellt. Dazu wurde das Gen *YPL158c* von genomischer DNA aus dem Stamm BY4741 PCR-amplifiziert und in ein ARS/CEN-Plasmid kloniert, das *YPL158c* unter die Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *TEF2*-Promotors stellte und zusätzlich das Protein N-terminal mit einem Myc3-Epitop fusionierte. Das so entstandene Plasmid pWS1470 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1-URA3*) wurde anschließend in den Stamm W4275 (*slt2Δ::natMX4*) transformiert. Der resultierende Stamm W4829 wurde dann mit den Stämmen W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) und W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) gekreuzt und zur Sporulation gebracht.

In der Tetradenanalyse wurde schon sichtbar, dass die Doppelmutanten *swi5Δ slt2Δ* und *ypl158cΔ slt2Δ*, die *YPL158c* konstitutiv und Swi5-unabhängig exprimierten, bei 30 °C wieder ein normales Wachstum zeigen (Abbildung 5.6 A). Ein Vergleich zu den Doppelmutanten ohne konstitutive *YPL158c* Expression war dabei gut möglich, da bei der Tetradenanalyse auch Nachkommen gewachsen waren, die das zuvor transformierte ARS/CEN-Plasmid pWS1470 in der Meiose wieder verloren hatten. Nachkommen mit und ohne konstitutiver *YPL158c* Expression wuchsen also direkt nebeneinander und konnten gut zu einem Vergleich herangezogen werden. *YPL158c* konnte folglich das langsame Wachstum dieser Doppelmutanten supprimieren. Bestätigt wurde dies durch einen Wachstumstest bei 37 °C.



**Abbildung 5.6 Konstitutive YPL158c-Expression supprimiert Wachstumsdefekte der Doppelmutanten**

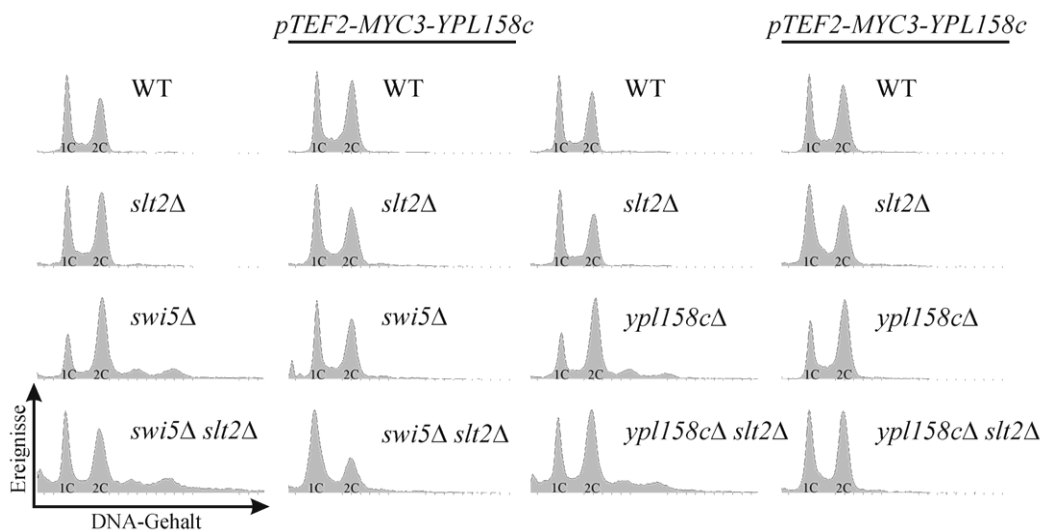
Der Stamm W4829 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1-URA3 slt2Δ::natMX4*) wurde mit jeweils W5853 (*swi5A::kanMX4*) und W5854 (*ypl158cA::kanMX4*) gekreuzt und anschließend zur Sporulation gebracht. **A**) Die Sporen wurden auf XYD Platten ausgelegt und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und aufgeschlüsselt. (WT) Wildtyp, (DM) Doppelmutante, (○) *swi5Δ*, (●) *ypl158cΔ*, (Δ) *slt2Δ*. Nachkommen, die das Plasmid pWS1470 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1-URA3*) enthalten sind durch grauen Hintergrund markiert (WT, DM, ○, ●, Δ). **B**) Für den Wachstumstest wurden jeweils vier haploide Nachkommen aus den jeweiligen Tetraden mit Tetratyp ausgewählt, die das Plasmid pWS1470 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1-URA3*) enthielten bzw. nicht enthielten. Dazu wurden Nachkommen mit Plasmid in SD-Ura und Nachkommen ohne Plasmid in SD++ Medium kultiviert. Anschließend wurden sie in Verdünnungsreihen auf XYD-Medium bzw. auf XYD-Medium + 1 M Sorbitol gespottet und 62 h bei 37 °C inkubiert.

Dazu wurden haploide Nachkommen dieser Kreuzung wieder in Verdünnungsreihen auf XYD-Medium sowohl mit als auch ohne Zugabe von 1 M Sorbitol gespottet und 62 Stunden bei 37 °C inkubiert. Doppelmutanten, die das Plasmid mit einer Kopie von *YPL158c* trugen, benötigten keine osmotische Stabilisierung durch Sorbitol, um bei erhöhter Temperatur wachsen zu können (Abbildung 5.6 B). Sie zeigten Wachstum, das dem des Wildtyps entsprach. Schäden in der Zellintegrität, Lyse der Zellen und das damit verbundene eingeschränkte Wachstum konnten durch die konstitutive Expression von *YPL158c* von einem *Swi5*-unabhängigen Promotor wieder hergestellt werden.

### 5.5.2 Defekte in der Cytokinese und Zellseparation werden behoben

Nachdem in der Tetradenanalyse und im Wachstumstest schon deutlich wurde, dass konstitutiv exprimiertes *YPL158c* das eingeschränkte Wachstum und die Thermosensitivität supprimieren konnte, war es interessant zu prüfen, ob auch die Defekte in der Cytokinese und Zellseparation behoben werden konnten.

56 |



**Abbildung 5.7 Konstitutive *YPL158c*-Expression supprimiert Defekte in der Cytokinese und Zellseparation**

Für die Durchflusszytometrie wurden jeweils vier haploide Nachkommen aus den jeweiligen Tetraden mit Tetratyp, die das Plasmid pWS1470 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1-URA3*) enthielten bzw. nicht enthielten, ausgewählt. Dazu wurden Nachkommen mit Plasmid in SD-Ura und Nachkommen ohne Plasmid in SD++ Medium bei 25 °C kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit Sytox Green.

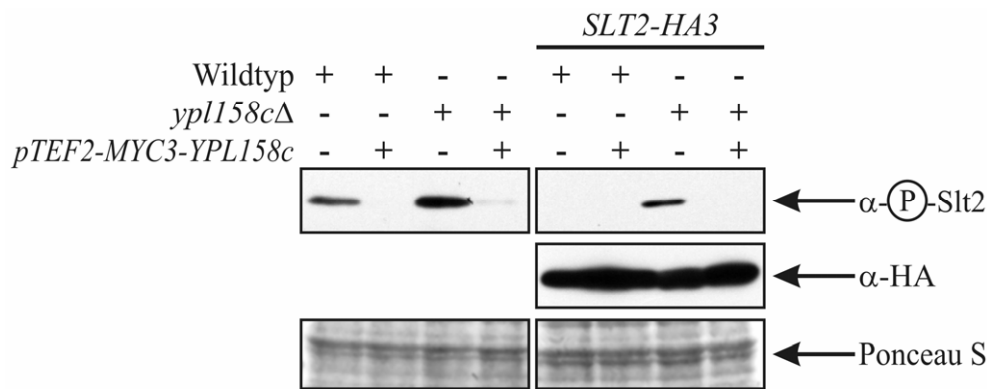
Die darauf folgende Analyse der Nachkommen vorausgegangener Kreuzungen in der Durchflusszytometrie zeigte ebenso deutlich, dass alleine die Expression von *YPL158c* von einem Swi5-unabhängigen Promotor hinreichend war, den Phänotyp eines DNA-Gehalts größer als 2 C, zu supprimieren (Abbildung 5.7). Die DNA-Profile sowohl der Einzelmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* als auch der Doppelmutanten *swi5Δ slt2Δ* und *ypl158cΔ slt2Δ* jeweils mit Swi5-unabhängiger Expression von *YPL158c* entsprachen wieder denen des Wildtyps. Dies wies darauf hin, dass die Defekte in der Cytokinese und Zellseparation nicht mehr bestanden und die Zellen sich vor dem Ausbilden einer neuen Knospe von der Tochterzelle getrennt hatten.

### 5.5.3 Der Zellintegritätsweg wird nicht mehr aktiviert

Die Phosphorylierung der MAP-Kinase Slt2 gibt Aufschluss darüber, ob der Zellintegritätsweg aktiviert wurde (Lee *et al.*, 1993). In einem der vorangegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Transkriptionsfaktors Swi5 oder seines Zielgens *YPL158c* eine Aktivierung des Zellintegritätswegs verursachte. Der Level an phosphoryliertem und aktiviertem Slt2 war in *swi5Δ* und *ypl158cΔ* Zellen deutlich erhöht (Abbildung 5.5). Sollte also *YPL158c* das einzige Zielgen von Swi5 sein, das für die Aktivierung des Zellintegritätswegs verantwortlich ist, sollte auch der Anteil an phosphoryliertem Slt2 in Zellen, die *YPL158c* unabhängig von Swi5 exprimieren, wieder verringert sein.

Um diese Frage zu beantworten wurde das ARS/CEN Plasmid pWS1470, das *YPL158c* unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *TEF2*-Promotors enthielt, in die Stämme BY4741 (Wildtyp), W4956 (*ypl158cΔ::kanMX4*), W4335 (*SLT2-HA3-His3MX6*) und W4976 (*SLT2-HA3-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX4*) transformiert und anschließend auf den Phosphorylierungsstatus von Slt2 hin untersucht.

In Abbildung 5.8 ist zu erkennen, dass der erhöhte Anteil an phosphoryliertem und somit aktiviertem Slt2 in *ypl158cΔ* Zellen wieder zu beobachten war aber durch eine episomale Kopie von *YPL158c* unter der Kontrolle des konstitutiv exprimierenden *TEF2*-Promotors wesentlich verringert wurde. Folglich fand eine Aktivierung des Zellintegritätsweges nicht mehr statt. Als Kontrolle diente hierbei die HA3 epitopmarkierte Form von Slt2, die zeigte, dass die Menge von Slt2 durch die konstitutive Expression von *YPL158c* nicht beeinflusst wurde. Dementsprechend lag die Zu- bzw. Abnahme von phosphoryliertem Slt2 nicht in der Zu- oder Abnahme der Slt2-Menge, sondern allein in dem Fehlen oder Vorhandensein von *Ypl158c* begründet.



**Abbildung 5.8 Phosphorylierung von Slit2 und Aktivierung des Zellintegritätswegs im Deletionsstamm *ypl158cΔ* bei konstitutiver Expression von *YPL158c* unter der Kontrolle des *TEF2*-Promotors**

Die Stämme BY4741 (Wildtyp), W6267 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC*), W4956 (*ypl158cΔ::kanMX4*), W6271 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1 ypl158cΔ::kanMX6*), W4335 (*SLT2-HA3-His3MX6*), W6279 (*SLT2-HA3-His3MX6 pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1*), W4976 (*SLT2-HA3-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX4*) und W6283 (*SLT2-HA3-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX4 pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1*) wurden bei 25°C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. In der Western-Blot-Analyse wurde phosphoryliertes Slit2 mit spezifischem polyklonalem Kaninchenantikörper und Slit2-HA3 12CA5 nachgewiesen. Eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S sicher gestellt.

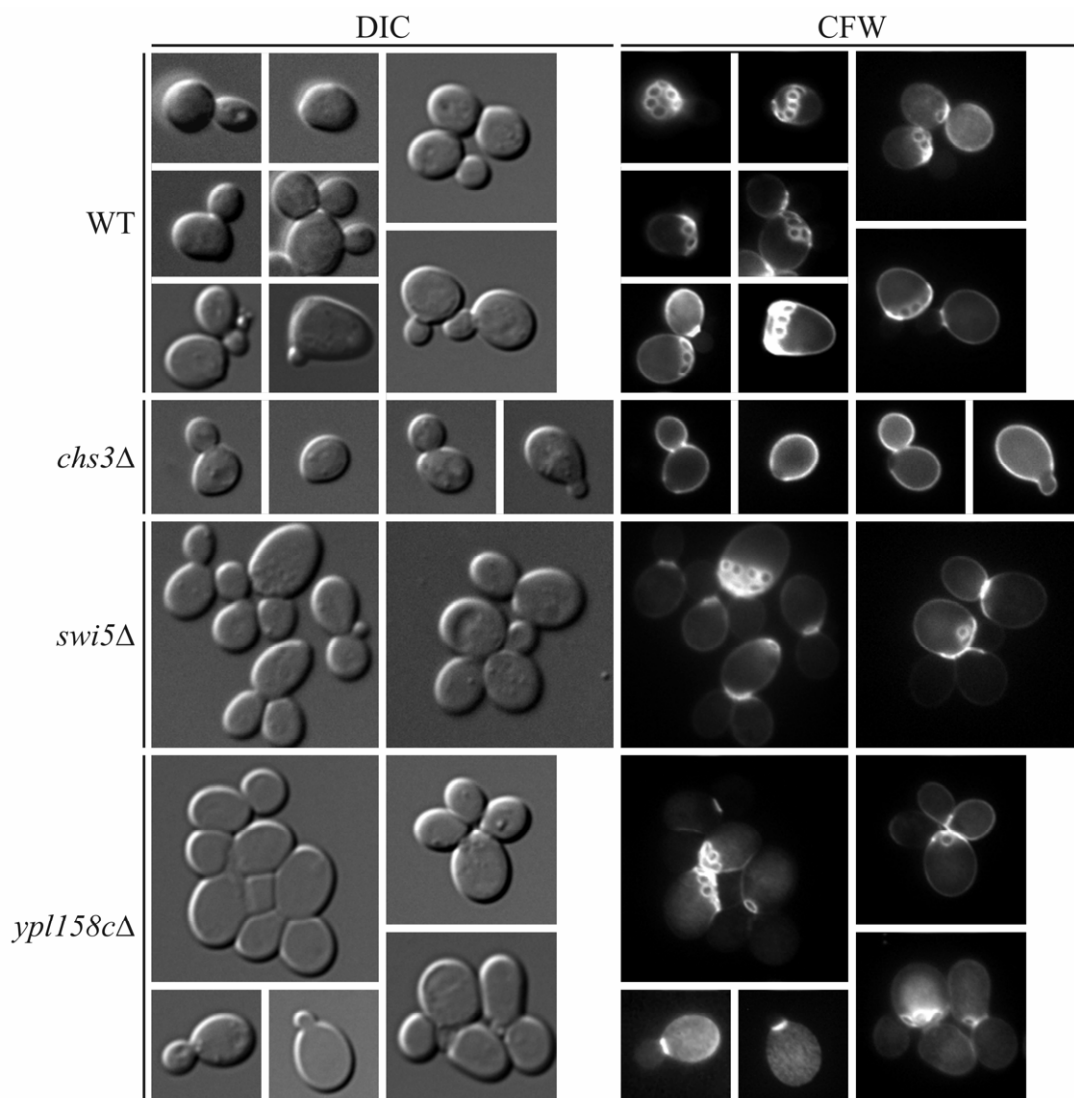
## 5.6 Weitere Phänotypen der Deletionsmutante *ypl158cΔ*

In den vorangegangenen Experimenten hatte es sich gezeigt, dass die Deletion von *YPL158c* einen Einfluss auf die Aktivierung des Zellintegritätsweges hat. Dieser wiederum kontrolliert die Synthese von Proteinen des Zellwandmetabolismus und beteiligt sich an der Organisation des Aktincytoskeletts (Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Hohmann, 2002; Jung *et al.*, 1999). Um nun mehr über die Funktion des Proteins Ypl158c herauszufinden, wurden genau diese Bereiche, die Chitinsynthese, das Knospungsmuster und die Organisation des Aktincytoskeletts in den Deletionsmutante *ypl158cΔ*, auch im Vergleich zur Deletionsmutante *swi5Δ*, untersucht.

### 5.6.1 Die Chitinsynthese ist nicht beeinträchtigt

Um zu prüfen, ob in den Mutanten *ypl158cΔ* und *swi5Δ* die Zellwand eine Beschädigung oder Beeinträchtigung zeigt, wurden diese mittels einer Calcofluorfärbung untersucht. Dies ist eine geeignete Methode, um die in der Zellwand befindlichen β-1,4-Glucane anzufärben und

dadurch mögliche Zellwanddefekte sichtbar zu machen. Da Slt2 und der Zellintegritätsweg unter anderem die Expression von Chs3, einer Chitinsynthase steuern (Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999), wurde die Deletionsmutante *chs3Δ* zum Vergleich herangezogen. Chs3 ist zusammen mit Chs1 für 90 % der Chitinsynthese der Zellwand verantwortlich (Ziman *et al.*, 1996).



**Abbildung 5.9 Chitinfärbung mit Calcofluor White**

Für die Färbung mit Calcofluor White wurden die Stämme BY4741 (Wildtyp), W6025 (*chs3Δ::kanMX4*), W3736 (*swi5Δ::natMX4*) und W4956 (*ypl158cΔ::kanMX4*) bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und 30 min bei RT mit Formaldehyd fixiert.

In Abbildung 5.9 ist zu erkennen, dass im Wildtyp die Knospungsnarben und der Chitinring am Knospenhals durch Calcofluor gut anzufärben waren. Diese Strukturen enthalten verglichen mit dem Rest der Zelle deutlich mehr Chitin. Dies konnte in dem Kontrollstamm, der Deletionsmutante *chs3Δ*, nicht beobachtet werden. Die Mutanten *swi5Δ* und *yp1158cΔ* zeigten ebenfalls Knospungsnarben und einen Chitinring am Knospenhals, der dem des Wildtyp entsprach. Eine Beeinträchtigung der Chitinsynthese war in *swi5Δ* und *yp1158cΔ* Mutanten trotz einem Defekt in der Cytokinese und Zellseparation somit nicht zu beobachten.

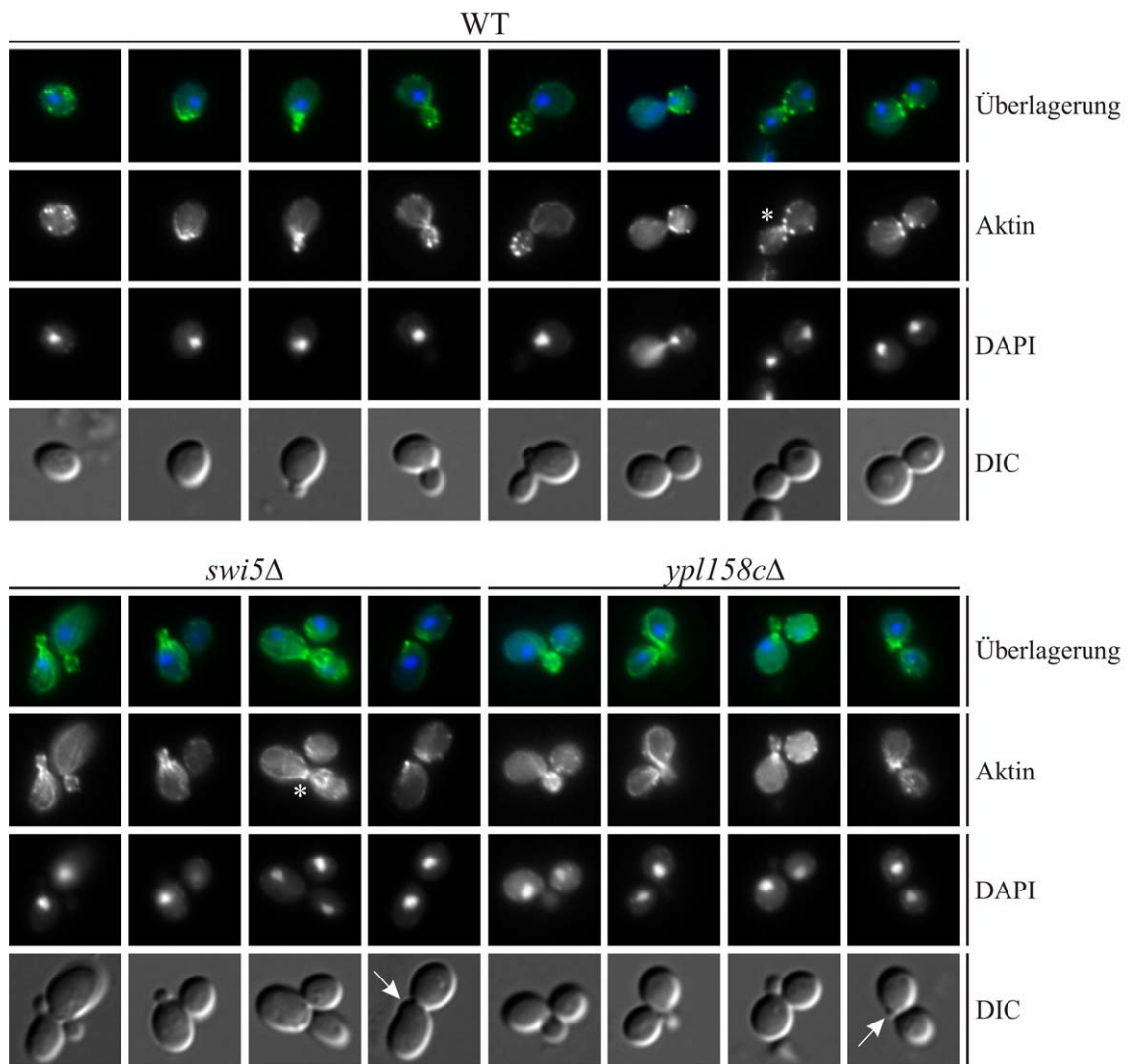
### 5.6.2 Das Aktincytoskelett lokalisiert normal

Die richtige Organisation des Aktincytoskeletts ist während des gesamten Zellzyklus sehr wichtig. Es besteht aus Aktinflecken und Aktinkabeln und ist immer auf die Stellen polarisierten Wachstums hin orientiert. Nach der Cytokinese erfährt es eine Umorientierung zum Knospenhals hin (Pruyne *et al.*, 2000a). Nach der Zellseparation, wenn die Zellen sich getrennt haben, orientiert sich das Aktincytoskelett wieder zu einer neuen Knospe hin.

Die Frage, ob eine fehlerhafte Orientierung des Aktincytoskeletts in den Deletionmutanten *swi5Δ* und *yp1158cΔ* vielleicht der Grund für einen Defekt in der Cytokinese bzw. Zellseparation ist, sollte im folgenden Experiment beantwortet werden. Dazu wurden die Aktinstrukturen durch fluoreszenzmarkiertes Phalloidin sichtbar gemacht (Abbildung 5.10).

60 |

Im Wildtyp war die Ausrichtung der Aktinflecken und Aktinkabel hin zum polarisierten Wachstum deutlich zu erkennen. Zu Beginn des Zellzyklus waren sie an der neuen Knospungsstelle konzentriert und verblieben an der Knospenspitze. Die Knospe wuchs zunächst apikal (bis Bild 5 von links). Danach orientierte sich das Aktincytoskelett um und die Knospe wuchs isotrop (Bild 6). Die Bildung des Aktin-Myosin-Ringes konnte ebenso beobachtet werden, wie die Umorientierung der Aktinflecken und Aktinkabel zum Knospenhals (Bild 7 und 8). Auch in den Deletionsmutanten wurde sichtbar, dass das Aktincytoskelett sich trotz der fehlerhaften Abschnürung der Tochterzelle neu zu einer neu gebildeten Knospe hin ausgerichtet hatte. Auch die Ausbildung des Aktin-Myosin-Ringes war zu beobachten. Die Aktinlokalisierung und Re-lokalisierung schien in den *swi5Δ* und *yp1158cΔ* Deletionsstämmen nicht beeinträchtigt und somit nicht die Ursache für die Defekte in der Cytokinese und Zellseparation zu sein.



**Abbildung 5.10 Nachweis von F-Aktin mittels Fluoreszenz-markiertem Phalloidin**

Für den Nachweis von F-Aktin mittels Phalloidin-Alexa488 wurden die Stämme BY4741 (Wildtyp), W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) und W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit DAPI. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert, der Aktin-Myosin-Ring mit einem Stern (\*).

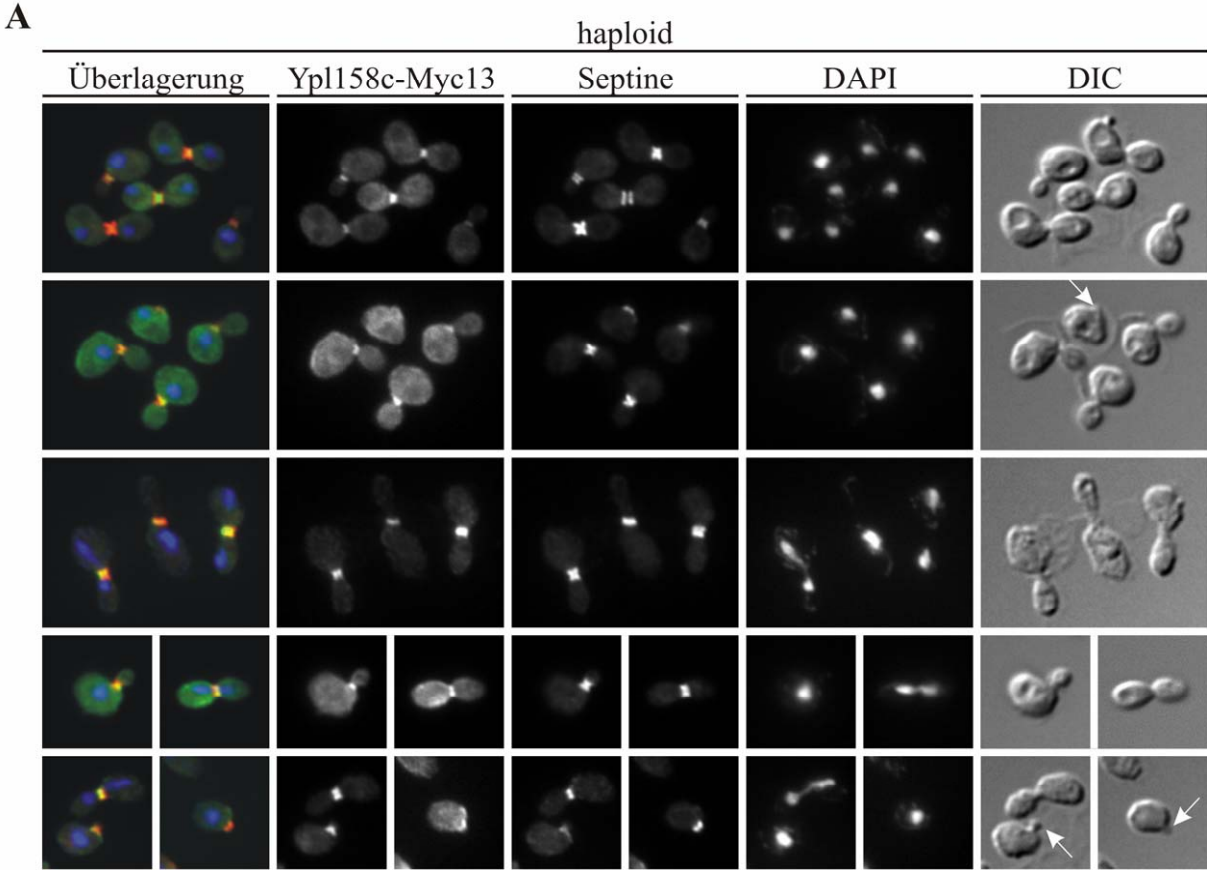
## 5.7 Ypl158c lokalisiert am Knospenhals

Der bisher beobachtete Phänotyp der Deletionsmutante *yp1158cΔ* zeigte einen Defekt in der Cytokinese und Zellseparation. Einen weiteren Hinweis auf die Funktion des Proteins sollte im nächsten Experiment durch seine Lokalisierung gegeben werden. Dazu wurde das Protein Ypl158c C-terminal mit einem Myc13 Epitop markiert (Ypl158c–Myc13) und in einer indirekten Immunfluoreszenz sowohl in haploiden als auch in homozygot diploiden Zellen sichtbar gemacht (Abbildung 5.11). Gleichzeitig fand eine Lokalisation des Septins Cdc11 statt. Septine sind essentiell für die Cytokinese. Sie bilden eine Ringstruktur am Knospenhals, die im Laufe des Zellzyklus breiter wird und sich verdoppelt. In der Mitose trennen sich die entstandenen Septinringe schließlich und verteilen sich auf Mutter- und Tochterzelle (Cid *et al.*, 2001; Longtine *et al.*, 2003).

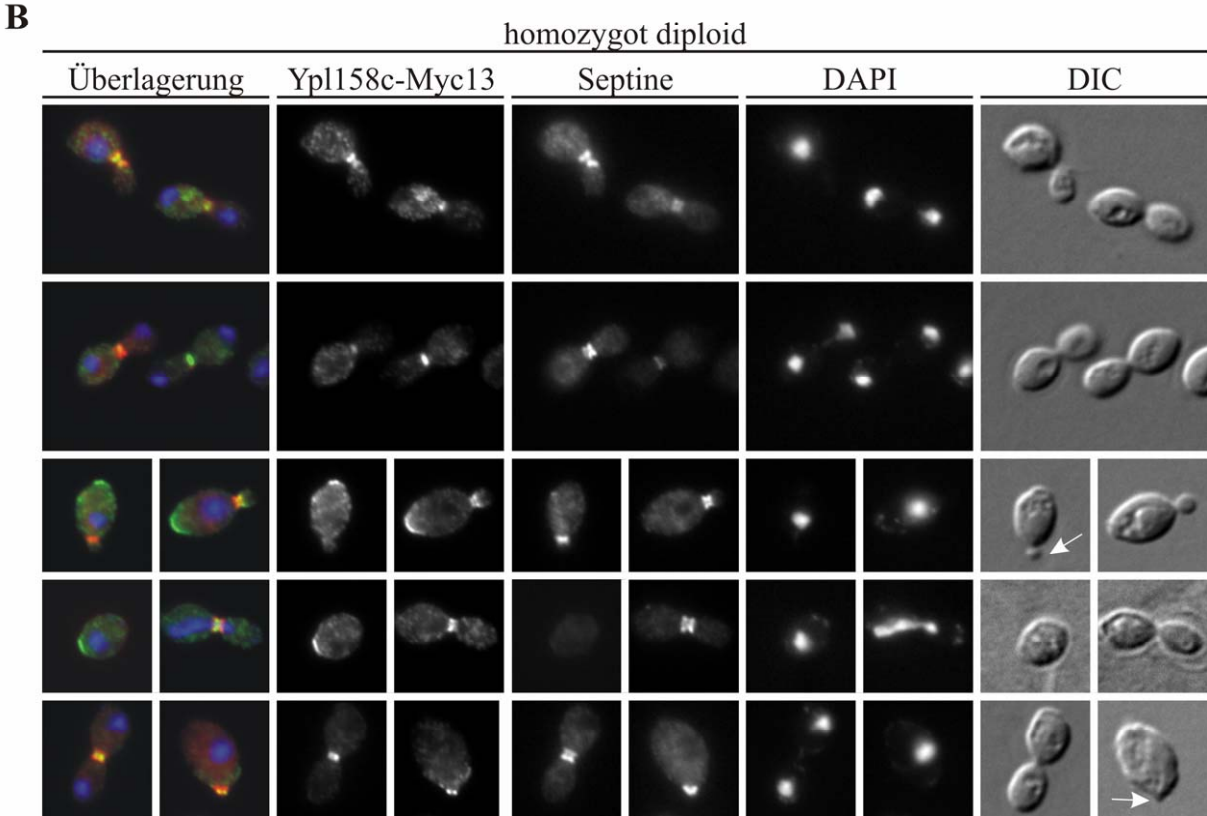
Ypl158c lokalisierte in haploiden (Abbildung 5.11 A) und diploiden Zellen (Abbildung 5.11 B) am Knospenhals, partiell überlappend mit Septinen und auch schon in Zellen, die erst eine sehr kleine Knospe gebildet hatten. Hierbei war eine genaue Zuordnung (Mutter-/Tochterseite) allerdings nicht möglich. In circa der Hälfte der diploiden Zellen ohne oder mit erst entstehender sehr kleinen Knospe verblieb ein wesentlicher Anteil an Ypl158c noch am Ort der vorherigen Knospe. Dies ließ darauf schließen, dass nach der Cytokinese und Zellseparation das Protein nicht sofort den Knospenhals verlässt, sondern noch an der alten Knospungsstelle verbleibt. In diploiden Zellen war dies sehr gut auszumachen, da hier ein bipolares Knospungsmuster vorliegt (Chant, 1999). Dabei haben die Zellen die Möglichkeit, die neue Knospe entweder am gegenüberliegenden Ende der vorausgegangenen Knospe auszubilden oder benachbart dazu (Abbildung 5.12). In haploiden Zellen liegt ein axiales Knospungsmuster vor (Abbildung 5.9), wobei die neue Knospe immer benachbart zur letzten Knospe entsteht (Chant, 1999). Hier war das Verbleiben von Ypl158c an der alten Knospungsstelle selten zu erkennen, da die neue Knospe sehr eng benachbart lag. In haploiden Zellen ohne beginnende Knospe war kein Ypl158c erkennbar.

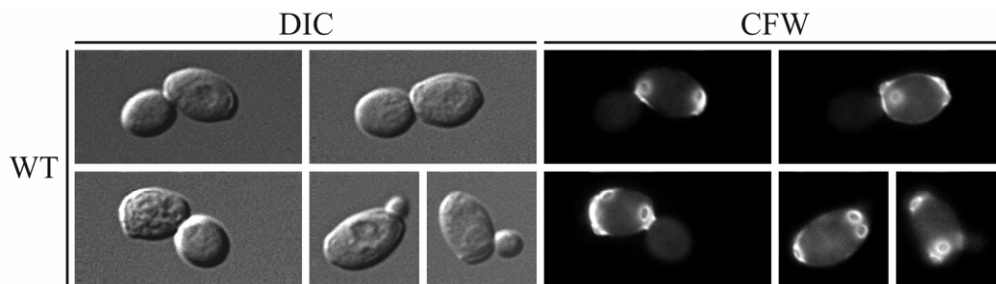
### Abbildung 5.11 Nachweis von Ypl158c mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die Stämme **A)** W4592 (*YPL158c-MYC13-His3MX6*) und **B)** W5322 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 / YPL158c-MYC13-His3MX6*) wurden bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Ypl158c-Myc13 wurde mit 9E10 und Anti-Maus-Alexa488 Sekundäntikörper und die Septine (Cdc11) mit Anti-Cdc11 und Anti-Kaninchen-Alexa546 Sekundäntikörper sichtbar gemacht. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert.



| 63





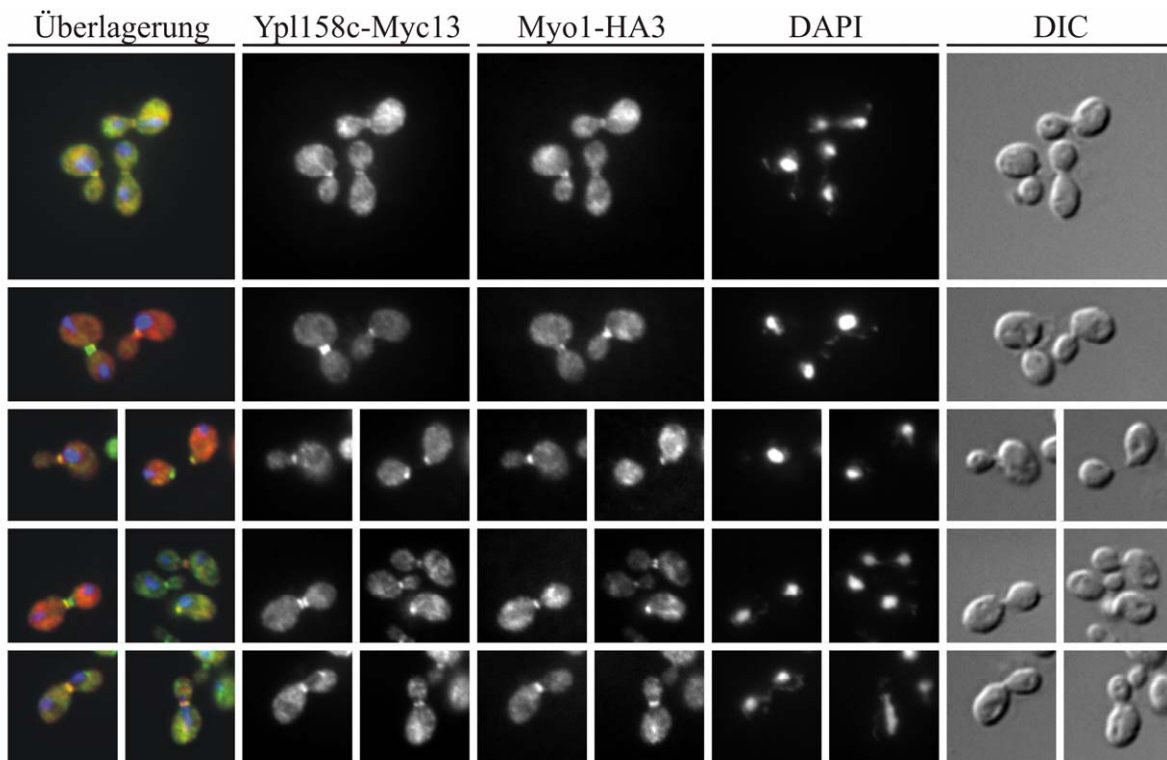
**Abbildung 5.12 Chitinfärbung diploider Zellen mit Calcofluor White**

Für die Färbung mit Calcofluor BY4743 (Wildtyp) bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und 30 min bei RT mit Formaldehyd fixiert.

64 |

Eine weitere entscheidende Komponente der Cytokinese ist Myo1, ein Teil des Aktin-Myosin-Ringes (Tolliday *et al.*, 2003). Es lagert sich früh im Zellzyklus als Ring am Knospenhals an und verbleibt dort, bis die Cytokinese vollendet ist (Bi *et al.*, 1998; Lippincott *et al.*, 1998b). Für die Bildung des kontraktiven Aktin-Myosin-Rings ist ein intakter Septinring am Knospenhals essentiell (Bi *et al.*, 1998; Dobbelaere *et al.*, 2004; Lippincott *et al.*, 1998b). Zum Ende der Anaphase wird F-Aktin in den Ring inkorporiert (Lippincott *et al.*, 1998b). Der Ring kontrahiert (Bi *et al.*, 1998) und die Cytokinese findet statt.

In einer zweiten indirekten Immunfluoreszenz wurde Ypl158c-Myc13 zusammen mit dem C-terminal HA-epitopmarkierten Myo1 sichtbar gemacht. In Abbildung 5.13 ist zu erkennen, dass Ypl158c auch partiell mit Myo1 am Knospenhals überlappend lokalisierte. Die Behandlung der Zellen bei der Vorbereitung der Immunfluoreszenz mit Zymolyase ist dafür verantwortlich, dass bei der Septinlokalisierung schon früh (vor der Cytokinese) Doppelringe zu erkennen waren. Der Verdau der Zellwand mit Zymolyase scheint die Ursache dafür zu sein, dass die Zellwand und die daran lokalisierten Strukturen sich auflockern und trennen. Das erklärt auch ein Auftreten eines Myo1-Doppelrings am Knospenhals. Es ist möglich, dass auch das Vorkommen der Ypl158c-Doppelringe in dem Zymolyase-Verdau seine Ursache finden. Die Lokalisation von Ypl158c am Knospenhals wurde durch eine veröffentlichte systematische Studie zur Lokalisation des Hefeproteoms gestützt (Huh *et al.*, 2003).



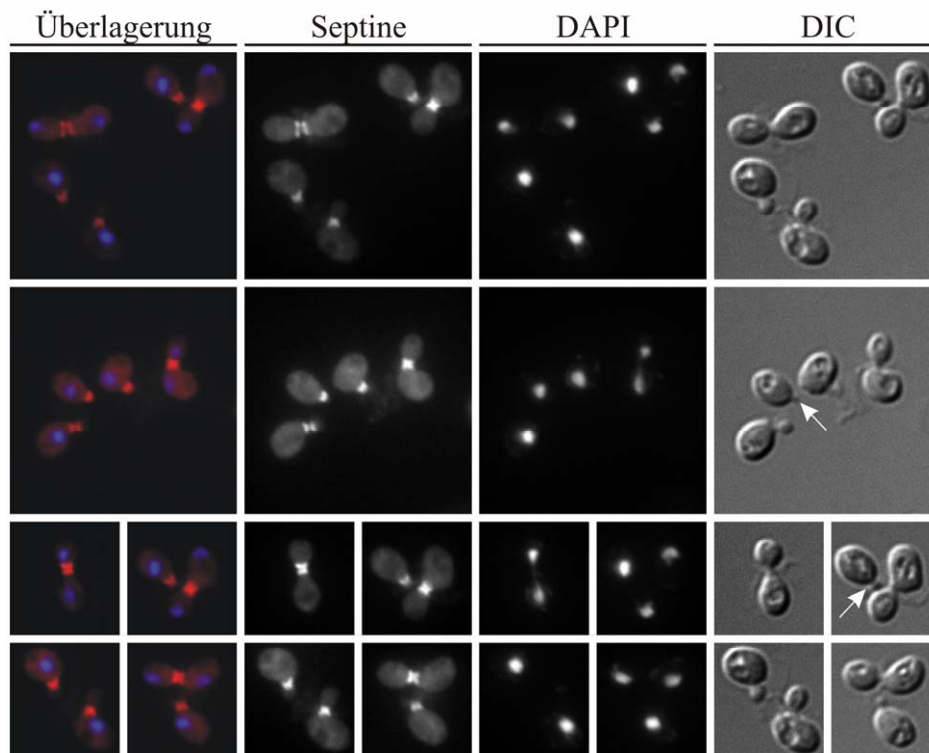
**Abbildung 5.13 Nachweis von Ypl158c und Myo1 mittels indirekter Immunfluoreszenz**

Der Stamm W5073 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 MYO1-HA3-natMX6*) wurde bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Ypl158c-Myc13 wurde mit A-14 und Anti-Kaninchen-Alexa488 Sekundärantikörper und Myo1-HA3 mit 12CA5 und Anti-Maus-Alexa546 Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt.

| 65

### 5.7.1 Keine Beeinträchtigung der Septin- und Myo1-Lokalisation in *ypl158cΔ* Deletionsmutanten

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass Ypl158c am Knospenhals zusammen mit Cdc11 und Myo1 lokalisiert, stellte sich die Frage, ob die Lokalisation der Septin- und Myo1-Ringe möglicherweise durch eine Deletion von *YPL158c* beeinträchtigt sein könnten. Dazu wurden Septine und Myo1 in einer indirekte Immunfluoreszenz in einem *ypl158cΔ* Deletionsstamm nachgewiesen. Die Abbildung 5.14 zeigt, dass die Septine weiterhin am Knospenhals lokalisierten und kein auffälliges Lokalisationsmuster aufwiesen, das sich von dem in Wildtypzellen (Abbildung 5.11) unterschied.

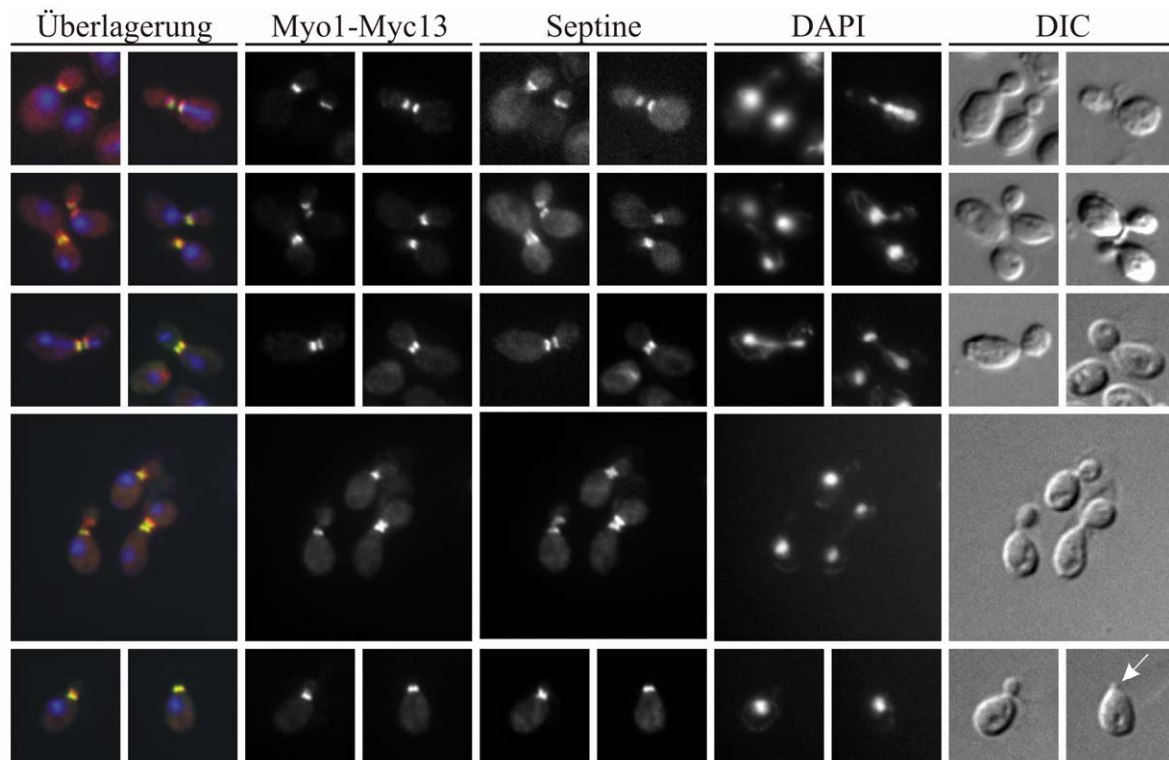


**Abbildung 5.14 Nachweis von Septinen in *ypl158cΔ* mittels indirekter Immunfluoreszenz**

66 |

Der Stamm W4956 (*ypl158cΔ::kanMX4*) wurde bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Die Septine (Cdc11) wurden mit Anti-Cdc11 und Anti-Kaninchen-Alexa546 Sekundärantikörper sichtbar gemacht und die DNA mit DAPI angefärbt. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert.

Auch die Myo1-Lokalisation am Knospenhals zeigte keine Beeinträchtigung (Abbildung 5.15). Zusätzlich konnte das vorherige Ergebnis bestätigt werden, dass auch die Septine keine veränderte Lokalisation aufwiesen. Beide Proteine lokalisierten schon früh im Zellzyklus am Knospenhals. Dort verblieben sie bis zur Cytokinese. Eine Veränderung im zeitlichen Auftreten konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. In diesem Experiment fiel auch auf, dass der zuvor in *ypl158cΔ* festgestellte Phänotyp von Zellen, die mehr als eine Knospe aufweisen



**Abbildung 5.15 Nachweis von Myo1 und Septinen in *ypl158cΔ* mittels indirekter Immunfluoreszenz**

Der Stamm W5204 (*MYO1-MYC13-His3MX6 ypl158cΔ::kanMX6*) wurde bei 25°C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Myo1-Myc13 wurde mit 9E10 und Anti-Maus-Alexa488 Sekundärantikörper und die Septine (Cdc11) mit Anti-Cdc11 und Anti-Kaninchen-Alexa546 Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert.

| 67

(Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4), in der Immunfluoreszenz nicht mehr beobachtet werden konnte. Die Knospen, die durch eine fehlerhafte Cytokinese und Zellseparation an der bereits neu knospenden Mutterzelle verblieben waren, wurden durch den Verdau mit Zymolyase von der Mutter getrennt. Auch sorgte der Zymolyase-Verdau wieder für das Auftreten von Myo1-Doppelringen und früh auftretenden Doppelringen der Septine.

### 5.7.2 Lokalisation von Ypl158c in Zellseparationsmutanten

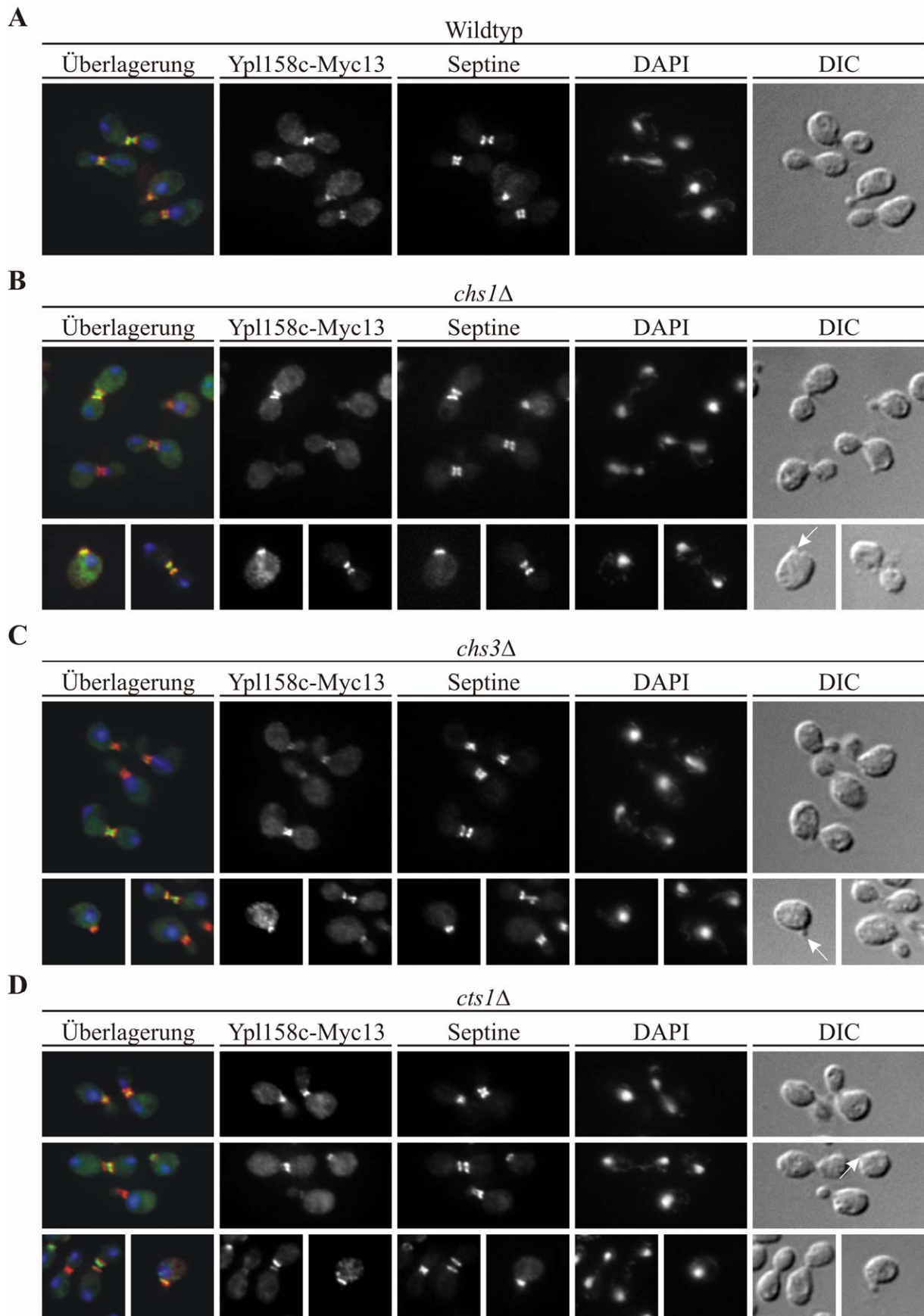
An der Cytokinese und Zellseparation sind mehrere Proteine beteiligt. Dabei spielt die Bildung des trilaminaren Septums eine essentielle Rolle (Bi, 2001). Für den Aufbau des Septums, das aus Chitin besteht, sind Chitinsynthasen, kodiert durch *CHS1*, *CHS2* und *CHS3*, verantwortlich (Lesage *et al.*, 2005). Chs2 bildet das Chitin des primären Septums, Chs3 legt den Chitinring am Knospenhals ab und synthetisiert das Chitin der lateralen Zellwand und Chs1 repariert nach der Zellseparation durch den Verdau des Chitins entstandene Schäden (Lesage *et al.*, 2005). *CTS1* kodiert für eine Endochitinase, die das primäre Septum partiell abbaut und deren Deletion zu einem Defekt in der Zellseparation führt (Adams, 2004).

Es sollte nun untersucht werden, ob die Lokalisation von Ypl158c in Abhängigkeit dieser Proteine steht und in Deletionsmutanten der zugehörigen Gene verändert ist.

Dazu wurde Ypl158c-Myc13 in einer indirekten Immunfluoreszenz in den Stämmen W5585, W5587 und W5589, in denen jeweils das Gen *CHS1*, *CHS3* bzw. *CTS1* deletiert war, nachgewiesen (Abbildung 5.16). Da in dem verwendeten Stammhintergrund die Deletion von *CHS2* letal ist, konnte diese Mutante für dieses Experiment nicht herangezogen werden. Im Vergleich zum Wildtyp konnte in der Lokalisation von Ypl158c-Myc13 in diesen Experimenten kein Unterschied festgestellt werden. Ypl158c lokalisierte nach wie vor schon früh im Zellzyklus am Knospenhals und blieb dort bis zur Cytokinese. Auch eine Auswirkung des Cytokinese- und Zellseparationsdefektes in den Mutanten konnte, wie auch schon in *ypl158cΔ* aufgrund des Verdau mit Zymolyase nicht festgestellt werden. Daraus war zu schließen, dass die Proteine Chs1, Chs3 und Cts1 folglich nicht für die Lokalisation von Ypl158c notwendig sind.

#### Abbildung 5.16 Nachweis von Ypl158c in verschiedenen Deletionsmutanten der Zellseparation mittels indirekter Immunfluoreszenz

Die Stämme **A)** W4592 (*YPL158c-MYC13-His3MX6*), **B)** W5585 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 chs1Δ::kanMX6*), **C)** W5587 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 chs3Δ::kanMX6*) und **D)** W5589 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 cts1Δ::kanMX6*) wurden bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Ypl158c-Myc13 wurde mit 9E10 und Anti-Maus-Alexa488 Sekundärantikörper, die Septine (Cdc11) mit Anti-Cdc11 (y-415) und Anti-Kaninchen-Alexa546 Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert.



### 5.7.3 Keine genetischen Interaktionen mit Zellseparationsmutanten

Es ist bekannt, dass Gene aus dem Zellintegritätsweg mit Genen aus der Cytokinese und Zellseparation genetische Wechselwirkungen zeigen (Tabelle 5.1). Manche ihrer Genprodukte lokalisieren am Knospenhals.

**Tabelle 5.1 Liste mit einigen aus der Literatur bekannten genetischen Interaktionen**

Standard Name	Standard Name und Funktion	Genetischer Effekt	Literatur
<i>CHS1</i>	<i>BCK1</i> : MEKK des Zellintegritätsweges	letal	Tong <i>et al.</i> , 2004; Lesage <i>et al.</i> , 2005
<i>CHS3</i>	<i>BCK1</i> : MEKK des Zellintegritätsweges	letal	Tong <i>et al.</i> , 2004; Lesage <i>et al.</i> , 2005
	<i>SLT2</i> : MAPK des Zellintegritätsweges	letal	Tong <i>et al.</i> , 2004;
<i>SKT5</i>	<i>SLT2</i> : MAPK des Zellintegritätsweges	langsam wachsend	Tong <i>et al.</i> , 2004; Lesage <i>et al.</i> , 2005
	<i>BCK1</i> : MEKK des Zellintegritätsweges	letal	Tong <i>et al.</i> , 2004; Lesage <i>et al.</i> , 2005

70 |

Ypl158c lokalisiert ebenfalls am Knospenhals und scheint dort eine Rolle in der Cytokinese und Zellseparation zu spielen. Um Ypl158c in seiner Rolle nun genetisch weiter einordnen zu können, wurden genetische Interaktionen zwischen *SLT2* mit Genen untersucht, deren Genprodukte ebenfalls am Knospenhals lokalisieren und eine Funktion in der Cytokinese und Zellseparation haben. Da nun *YPL158c* und *SWI5* mit *SLT2* genetisch interagieren, sollte *SLT2* auch mit anderen Proteinen aus der Cytokinese und Zellseparation genetische Wechselwirkung zeigen. Diese sollten wiederum aber nicht mit *YPL158c* genetisch interagieren. Die Deletionsmutanten *slt2Δ* und *ypl158cΔ* wurden mit einer Reihe von Deletionsmutanten der Cytokinese und Zellseparation gekreuzt und in einer anschließenden Tetradenanalyse auf genetische Interaktionen getestet.

Weitere Kreuzungen und die Suche nach genetischen Interaktionen ergab sich aus folgender Überlegung. Die Cytokinese ist ein Prozess, der viele Schritte beinhaltet. Den Beginn macht die Assemblierung und die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes. Nach der Kontraktion löst der Ring sich wieder auf und zwischen Mutter- und Tochterzelle verbleibt eine schmale cytoplasmatische Brücke, die durch Einschnürung getrennt wird (Dobbelaere *et al.*, 2004). Dies wird durch drei voneinander unabhängige Reaktionswege bewerkstelligt, die durch Myo1, Hof1 und Cyk3 beschrieben werden. Myo1 sorgt für die Kontraktion des Aktin-

Myosin-Ringes, Hof1 für eine korrekte Aktinorganisation und Zelltrennung. Das bisher am wenigsten verstandene Cyk3 ist an der Zelltrennung beteiligt und vermutlich auch an der Einschnürung zwischen Mutter- und Tochterzelle (Norden *et al.*, 2006). Eine Deletion in *MYO1*, *HOF1* oder *CYK3* stört die Cytokinese nur gering, wohingegen eine Deletion von zwei dieser drei Gene gleichzeitig eine Cytokinese verhindert und sich auf die Zellen letal auswirkt. Um Ypl158c möglicherweise in einen dieser drei Cytokinesewege einzuordnen, wurden auch hier die genetischen Interaktionen mit Vertretern dieser drei Wege geprüft.

Die Tetradenanalyse bestätigte die genetische Interaktion zwischen *SLT2* und *CHS3*, weitere genetische Interaktionen mit *SLT2* oder *YPL158c* konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Tabelle 5.2).

**Tabelle 5.2 Liste getesteter genetischer Interaktionen**

Die Stämme W5735 (*ypl158cΔ::natMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2*) und W4275 (*slt2Δ::natMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2*) wurden mit folgenden Deletionsstämmen der EUROSCARF-Kollektion gekreuzt: W6018 (*cts1Δ::kanMX4*), W6019 (*skt5Δ::kanMX4*), W6020 (*dse2Δ::kanMX4*), W6021 (*egt2Δ::kanMX4*), W6022 (*scw11Δ::kanMX4*), W6023 (*skm1Δ::kanMX4*), W6024 (*chs1Δ::kanMX4*), W6025 (*chs3Δ::kanMX4*), W6026 (*dse1Δ::kanMX4*) und W6029 (*eng1Δ::kanMX4*). Der Stamm W5538 (*ypl158cΔ::natMX4*) wurde mit folgenden Deletionsstämmen der EUROSCARF-Kollektion gekreuzt: wiederholt mit W6019, W6024 und W6025, außerdem mit W6688 (*bni1Δ::kanMX4*), W6690 (*chs6Δ::kanMX4*), W6691 (*chs5Δ::kanMX4*), W6692 (*hof1Δ::kanMX4*), W6693 (*bnr1Δ::kanMX4*), W6696 (*bni4Δ::kanMX4*) und W6697 (*chs7Δ::kanMX4*). Die Sporen wurden auf XYD Platten ausgelegt und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Genotypen der angewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Selektionsmarkern bestimmt und aufgeschlüsselt.

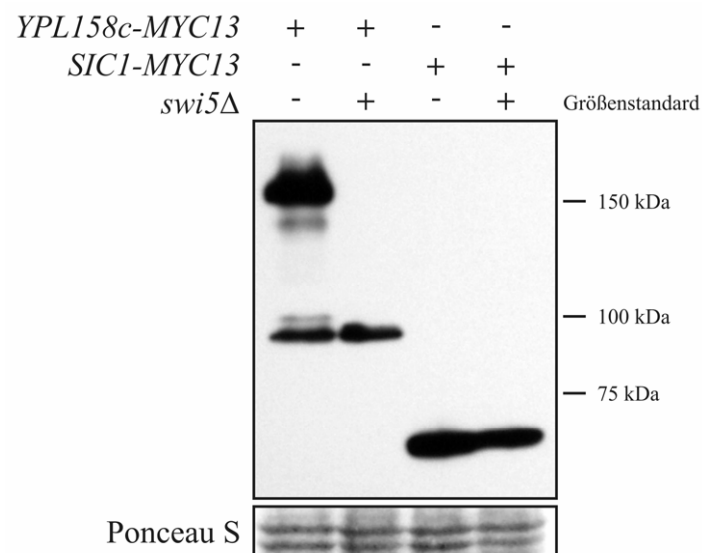
System. Name	Standard Name / Alias	Funktionsbeschreibung nach SGD	Genetischer Effekt mit <i>SLT2</i>	Genetischer Effekt mit <i>YPL158c</i>
<i>YNL192w</i>	<i>CHS1</i>	Chitinsynthase I	keiner	keiner
<i>YBR023c</i>	<i>CHS3</i>	Chitinsynthase III	letal	keiner
<i>YBL061c</i>	<i>CHS4</i> <i>SKT5</i>	rekrutiert Chs3 über eine Interaktion mit Bni4 an den Knospenhals	nicht getestet langsam wachsend nach Tong <i>et al.</i> , 2004 und Lesage <i>et al.</i> , 2005	keiner
<i>YNL233w</i>	<i>BNI4</i>	rekrutiert Chs3 über eine Interaktion mit Skt5 an den Knospenhals	nicht getestet letal nach Tong <i>et al.</i> , 2004	keiner
<i>YLR286c</i>	<i>CTSI</i>	Endochitinase der Zellseparation	keiner	keiner

System. Name	Standard Name / Alias	Funktionsbeschreibung nach SGD	Genetischer Effekt mit <i>SLT2</i>	Genetischer Effekt mit <i>YPL158c</i>
<i>YER124c</i>	<i>DSE1</i>	wahrscheinlich beteiligt am Zellwandmetabolismus	keiner	keiner
<i>YHR143w</i>	<i>DSE2</i>	Ähnlich zu Glucanasen, degradiert Zellwand von der Tochterseite aus	keiner	keiner
<i>YNL327w</i>	<i>EGT2</i>	Endoglucanase der Zellseparation	keiner	keiner
<i>YNR067c</i>	<i>ENG1</i> <i>DSE4</i>	Ähnlich zu Glucanasen, degradiert Zellwand von der Tochterseite aus	keiner	keiner
<i>YGL028c</i>	<i>SCW11</i>	Zellwandprotein, ähnlich zu Glucanasen	keiner	keiner
<i>YOL113w</i>	<i>SKM1</i>	Proteinkinase, ähnlich zu Ste20 und Cla4	keiner	keiner
<i>YNL217c</i>	<i>BN11</i>	Formin, beteiligt am Myo1-Reaktionsweg	nicht getestet letal nach Tong <i>et al.</i> 2004	keiner
<i>YLR330w</i>	<i>CHS5</i>	Komponente des Exomerkomplexes, beteiligt am Cyk3-Reaktionsweg	nicht getestet letal nach Tong <i>et al.</i> , 2004	keiner
<i>YJL099w</i>	<i>CHS6</i>	Komponente des Exomerkomplexes, beteiligt am Cyk3-Reaktionsweg	nicht getestet letal nach Tong <i>et al.</i> 2004 und Lesage <i>et al.</i> 2005	keiner
<i>YHR142w</i>	<i>CHS7</i>	Beteiligt an Chitinbiosynthese, reguliert Chs3 Export aus dem ER	nicht getestet letal nach Tong <i>et al.</i> , 2004 und Lesage <i>et al.</i> , 2005	keiner
<i>YIL159w</i>	<i>BNR1</i>	Formin, beteiligt am Hof1-Reaktionsweg, funktionell redundant mit <i>BN11</i>	nicht getestet	keiner
<i>YMR032W</i>	<i>HOF1</i>	Lokalisiert am Knospenhals, benötigt für Cytokinese	nicht getestet	Nicht auswertbar

## 5.8 Ypl158c in *swi5Δ*

### 5.8.1 Ypl158c ist in *swi5Δ*-Mutanten in verringerter Menge vorhanden

Die vorangegangenen Immunfluoreszenzen zeigten, dass Ypl158c die meiste Zeit während des Zellzyklus am Knospenhals lokalisiert. Die Expression des Gens *YPL158c* steht jedoch in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors Swi5 (Simon *et al.*, 2001). Es stellte sich also die Frage, ob die Proteinmenge von Ypl158c auch in Abhängigkeit von Swi5 steht. Dazu wurde Ypl158c in der Western-Blot-Analyse untersucht. Dabei wurden Stämme verwendet, die Myc-epitopmarkiertes Ypl158c sowohl im Wildtyp als auch in einer *swi5Δ* Deletionsmutante synthetisierten. Als Kontrolle wurde Myc13-epitopmarkiertes Sic1, ein weiteres Zielgen von Swi5, herangezogen.



| 73

#### Abbildung 5.17 Nachweis von Ypl158c und Sic1 in Wildtyp und *swi5Δ*

Die Stämme W5117 (*YPL158c-MYC13-natMX4 bar1Δ::LEU2*), W5120 (*YPL158c-MYC13-natMX4 bar1Δ::LEU2 swi5Δ::His3MX6*), W4332 (*SIC1-MYC13-HisMX6*) und W4440 (*SIC1-MYC13-natMX4 swi5Δ::His3MX6*) wurden bei 25 °C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. In der Western-Blot-Analyse wurde Ypl158c-Myc13 und Sic1-Myc13 mit 9E10 nachgewiesen. Eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S sicher gestellt.

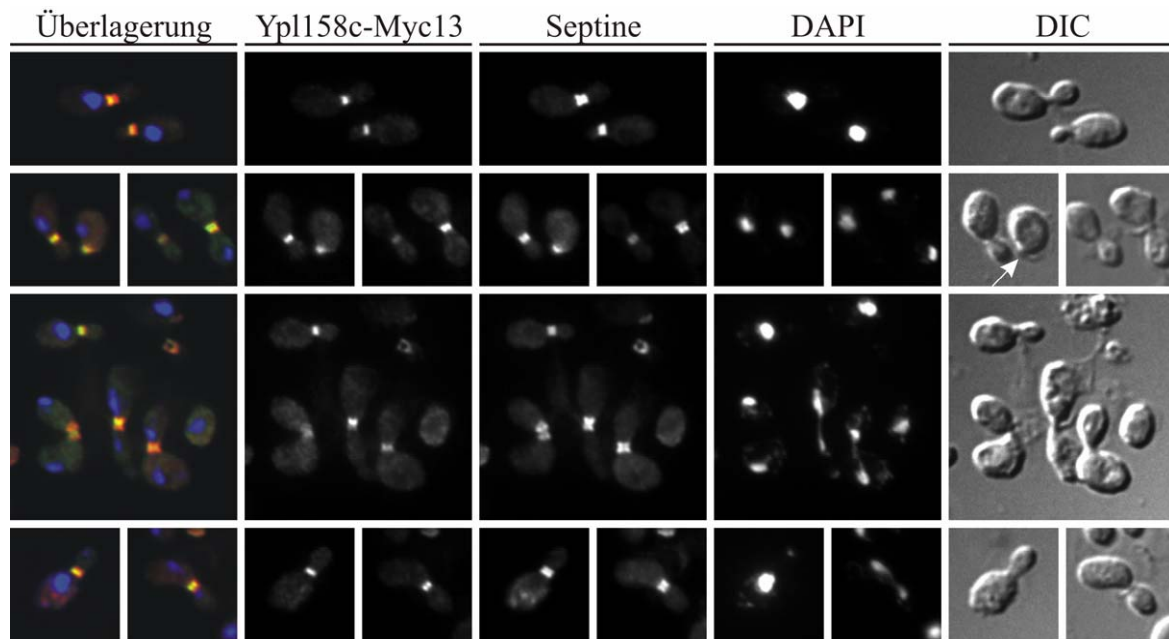
In diesem Experiment (Abbildung 5.17) waren mehrere Dinge zu erkennen. Als erstes fiel auf, dass Ypl158c in der Western-Blot-Analyse mehrere Banden zeigte. Die zwei prominentesten Banden migrierten im SDS-Gel bei ca. 150 kDa und 90 kDa. Ypl158c selbst hat eine Größe von 84,8 kDa, das Myc13-Epitop von 19,8 kDa. Folglich hat Ypl158c-Myc13 eine Gesamtgröße von 104,6 kDa. Es wird angenommen, dass die langsamer wandernde Form des Proteins die vollständige Länge besitzt und dass die schneller migrierende Form ein Abbauprodukt ist, das bei der Proteinaufarbeitung entstanden ist. Das veränderte Laufverhalten des Proteins könnte aus dem Vorhandensein einer stark geladenen Glutamat-/Aspartatreichen Region am C-Terminus resultieren (Armstrong *et al.*, 1993). In den letzten 108 Aminosäuren des Proteins alleine, sind 30 Glutamat- und 16 Aspartat-Reste zu finden (siehe auch Abbildung 5.24). Außerdem wird das Migrationsverhalten der Proteine im SDS-Gel zusätzlich durch das Myc13-Epitop beeinflusst, das ebenfalls viele Glutamat-Reste enthält. Dies zeigte sich auch an Sic1-Myc13, welches eine Gesamtgröße von 52 kDa hat (Sic1: 32,2 kDa) und in der Western-Blot-Analyse eine Bande bei ca. 65 kDa aufwies. Des Weiteren fiel auf, dass Ypl158c in *swi5Δ* Zellen kaum noch in voller Länge nachzuweisen war, sondern nur noch über das Abbauprodukt der Aufarbeitung. Die Menge dieses Aufarbeitungsartefakts schien dabei nicht zu variieren. Auch Sic1 war in *swi5Δ* lediglich in der Menge reduziert und nicht zur Gänze verschwunden.

74 |

### 5.8.2 Ypl158c lokalisiert in *swi5Δ* nach wie vor am Knospenhals

Nachdem das vorangegangene Experiment zeigte, dass Ypl158c in *swi5Δ* Zellen sehr stark reduziert war, sollte überprüft werden, ob eine Lokalisation des Proteins in der indirekten Immunfluoreszenz noch möglich ist. Dazu wurde das C-terminal epitopmarkierte Protein (Ypl158c-Myc13) in einer Co-Lokalisation mit dem Septin Cdc11 in *swi5Δ* Mutanten sichtbar gemacht.

Die Abbildung 5.18 zeigt, dass, auch wenn *SWI5* deletiert war, nach wie vor eine Lokalisation des Proteins Ypl158c, möglich war. Ypl158c lokalisierte auch in dieser Deletionsmutante schon in Zellen mit sehr kleiner Knospe am Knospenhals, ebenso in allen anderen Zellzyklusstadien bis hin zu Zellen, die eine große Knospe und zwei getrennte Kerne hatten.



**Abbildung 5.18 Nachweis von Ypl158c in *swi5Δ* mittels indirekter Immunfluoreszenz**

Der Stamm wurde W4648 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 swi5Δ::natMX4*) wurde bei 25 °C in XYD Medium kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Formaldehyd 30 min bei RT fixiert. Ypl158c-Myc13 wurde mit 9E10 und Anti-Maus-Alexa488 Sekundärantikörper und die Septine (Cdc11) mit Anti-Cdc11 (y-415) und Anti-Kaninchen-Alexa546 Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert

| 75

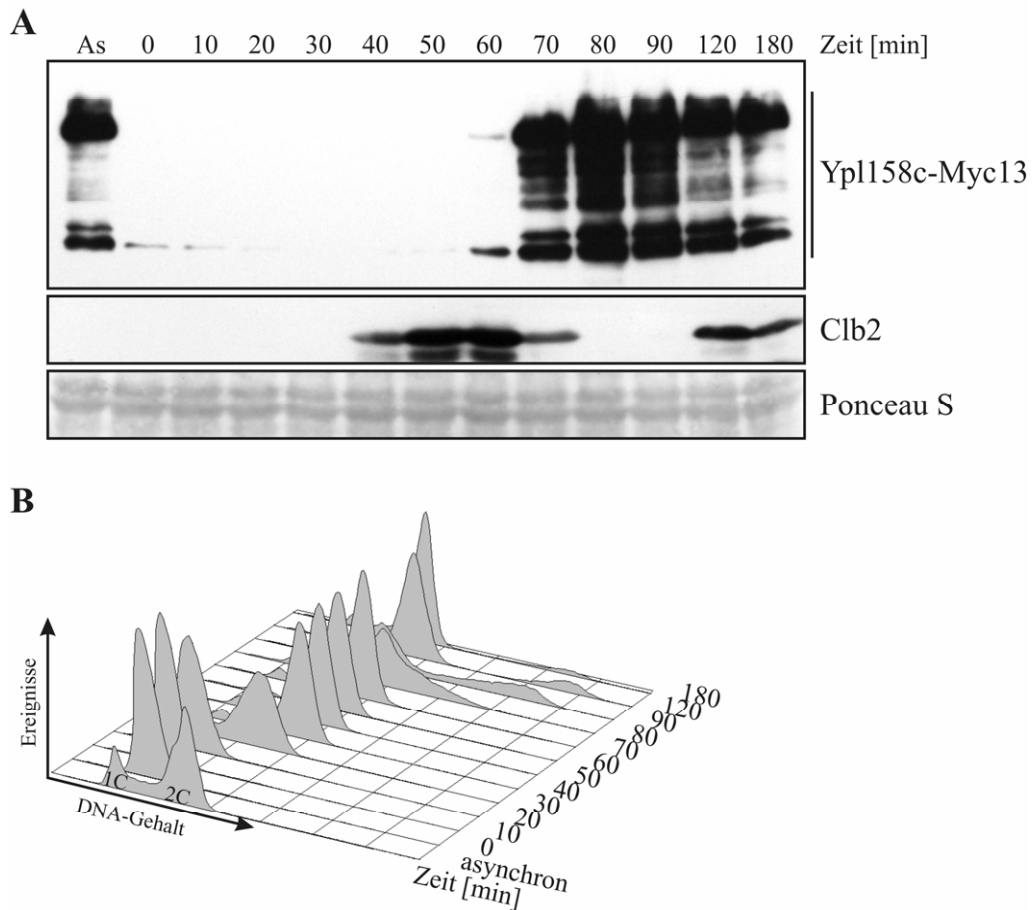
## 5.9 Ypl158c im Zellzyklusverlauf

In der Immunfluoreszenz trat Ypl158c schon früh am Knospenhals auf. Dort verblieb es bis zum Ende der Cytokinese. Das Transkriptionsprofil aber von *YPL158c* hat seinen Höhepunkt am M/G1 Übergang und kann dem *SIC1*-Subcluster zugeordnet werden, welches auch *ASH1*, *CHS1* und *CTS1* beinhaltet (Spellman *et al.*, 1998). Um nun zu prüfen, ob auf Proteinebene tatsächlich eine entsprechende Fluktuation sichtbar ist, wurde epitopmarkiertes Ypl158c-Myc13 in der Western-Blot-Analyse im Verlauf eines Zellzyklus und in verschiedenen Zellzyklus-Arreststadien, die durch Zugabe von geeigneten Agenzien erreicht wurden, beobachtet.

### 5.9.1 Ypl158c tritt zyklisch im Zellzyklus auf

Um das Auftreten des Proteins Ypl158c im Verlauf eines Zellzyklus zu beobachten, wurde ein Synchronexperiment durchgeführt. Dazu wurden exponentiell wachsende Zellen mit Myc13-epitopmarkiertem Ypl158c durch das Paarungspheromon  $\alpha$ -Faktor in der G1-Phase arretiert. Anschließend wurden die Zellen durch Umsetzen in pheromonfreies Medium synchron aus dem Arrest in den nächsten Zellteilungszyklus entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die Western-Blot-Analyse und die Durchflusszytometrie entnommen.

In Abbildung 5.19 A ist zu erkennen, dass Ypl158c in asynchronen Zellen gut nachzuweisen war, nicht aber in  $\alpha$ -Faktor arretierten. Es trat erst nach 60 min schwach und nach 70 min wieder stark auf. Außerdem war ein Maximum nach 80 min erreicht, das nach 120 min und 180 min wieder dem Level der asynchronen Kultur entsprach. Als Kontrolle für den Verlauf des Zellzyklus diente das B-Typ Cyclin Clb2, das in der G2 und M-Phase akkumuliert (Fitch *et al.*, 1992; Spellman *et al.*, 1998) und am Ende der Mitose degradiert wird (Deshaies, 1997; Lew *et al.*, 1997). Vom zeitlichen Ablauf korrelierte das verstärkte Auftreten des Proteins Ypl158c zum einen mit der theoretischen Transkriptionsaktivierung durch Swi5 als auch mit dem Ereignis der Cytokinese, die anhand des DNA-Profiles aus der Durchflußzytometrie bei 80 min zu beobachten ist. Allerdings konnte man im DNA-Profil auch erkennen, dass die Zellen Schwierigkeiten hatten, die Cytokinese nach dem ersten Teilungszyklus zu vollziehen (Abbildung 5.19 B). Sie bildeten erneut Knospen, obwohl die vorherige Tochterzelle keine Abtrennung von der Mutterzelle erfahren hatte. Nach 80 min traten DNA-Gehalte von  $> 2 C$  auf, nach 120 min DNA-Gehalte von  $4 C$ . Nach 180 min war ein weiterer Teilungszyklus durchlaufen und die Zellen waren wieder in der Lage eine ordentliche Cytokinese durchzuführen. Bekanntermaßen haben Zellen, die lange künstlich im  $\alpha$ -Faktor-Arrest gehalten wurden, anschließend beim Entlassen in den Zellzyklus ein Problem die Cytokinese zu vollziehen (Amon, 2002). Es bleibt also fest zu halten, dass Ypl158c zyklisch zum Ende der Mitose verstärkt synthetisiert wird.

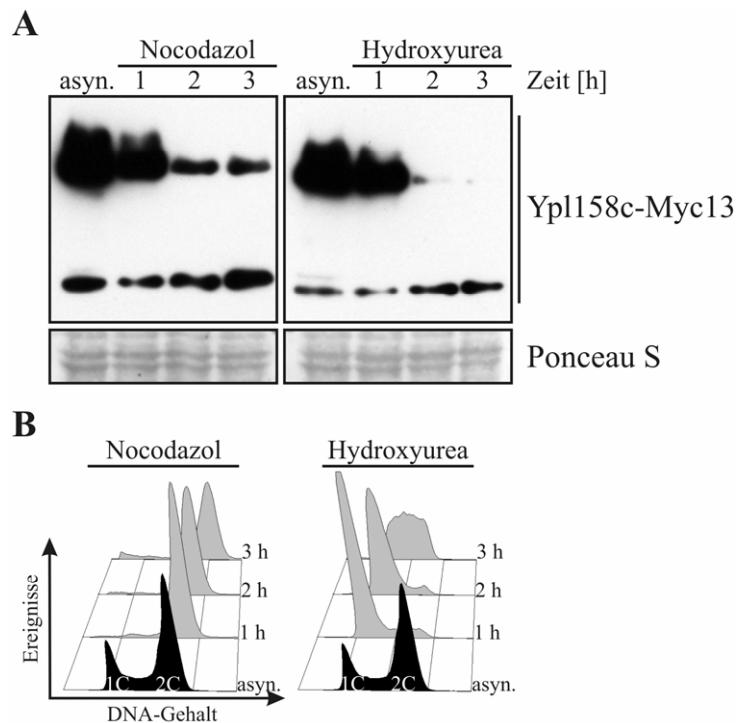


**Abbildung 5.19 Nachweis von Ypl158c im Zellzyklus nach dem Entlassen aus dem  $\alpha$ -Faktor-Arrest**

Der Stamm W6803 (*YPL158c-MYC13-natMX6 bar1 $\Delta$ ::LEU2 pep4 $\Delta$ ::URA3*) wurde bei 25 °C in XYD Medium kultiviert. Bei einer  $OD_{600} = 0,6$  wurden die Zellen durch Zugabe von  $\alpha$ -Faktor (Endkonzentration 50 ng/ml) 3,5 h bei 30 °C in der G1-Phase arretiert. Anschließend wurden sie bei 30 °C synchron in pheromonfreies Medium in den nächsten Teilungszyklus entlassen. Dabei wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben für die **A**) Western-Blot-Analyse und die **B**) Durchflusszytometrie genommen (As, asynchron: vor dem Arrest, 0 min: im  $\alpha$ -Faktor-Arrest). In der Western-Blot-Analyse wurde Ypl158c-Myc13 mit 9E10 nachgewiesen. Als Anhaltspunkt für den Verlauf des Zellzyklus diente Clb2, das mit polyklonalem Kaninchenserum nachgewiesen wurde. Eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S sicher gestellt. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit Sytox Green.

### 5.9.2 Ypl158c im S- und Metaphase-Arrest

Eine Möglichkeit dieses Ergebnis zu stützen, war das Nachweisen von Ypl158c in Zellen, die an anderer Stelle als in G1 im Zellzyklus arretiert wurden. Ein Arrest in der S-Phase wurde durch den Ribonukleotid-Reduktase-Inhibitor Hydroxyharnstoff (HU für Hydroxyurea) erreicht und ein Arrest in der Metaphase der Mitose durch das Spindelgift Nocodazol (Noc). Zellen, die Myc-epitopmarkiertes Ypl158c trugen, wurden durch diese Agenzien im Zellzyklus arretiert. Anschließend wurden in stündlichem Abstand Proben für die Western-Blot-Analyse und Durchflusszytometrie genommen.



**Abbildung 5.20 Nachweis von Ypl158c im Nocodazol- und Hydroxyharnstoff-Arrest**

Der Stamm W6803 (*YPL158c-MYC13-natMX6 bar1Δ::LEU2 pep4Δ::URA3*) wurde bei 25 °C in XYD Medium kultiviert. Bei einer  $OD_{600} = 0,7$  wurden die Zellen durch Zugabe von Nocodazol (Noc, Endkonzentration 7,5 µg/ml) in der Metaphase und durch Zugabe von Hydroxyharnstoff (HU, Endkonzentration 100 mM) in der S-Phase 3 h bei 30 °C arretiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die **A**) Western-Blot-Analyse und die **B**) Durchflusszytometrie genommen. In der Western-Blot-Analyse wurde Ypl158c-Myc13 9E10 nachgewiesen. Eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S sicher gestellt. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit Sytox Green.

Im Nocodazol-Arrest konnte Ypl158c zwar auch nach 3 h noch nachgewiesen werden, eine Abnahme der Proteinmenge über den Zeitverlauf des Arrestes konnte aber ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 5.20). Auch im S-Phase Arrest mit Hydroxyharnstoff konnte Ypl158c nach 1 h noch nachgewiesen werden. Die Proteindegradation verlief hier allerdings schneller, so dass nach 3 h kein Ypl158c mehr zu beobachten war.

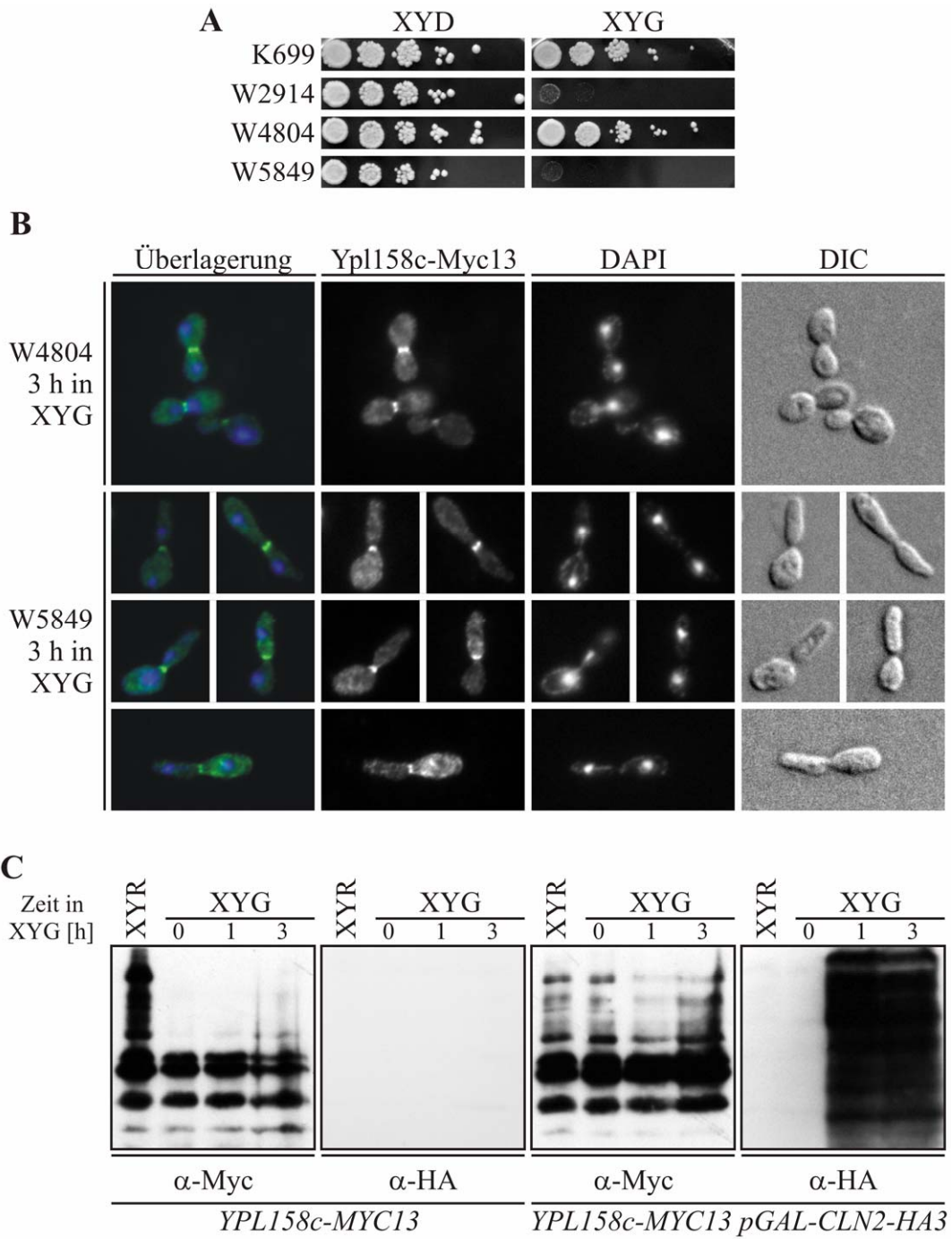
Das Ergebnis beider Arrestexperimente zeigt, dass Ypl158c instabil ist und bestätigt, dass das Protein nur zum Ende der Mitose verstärkt synthetisiert wird, dann, wenn es für die Cytokinese und Zellseparation benötigt wird.

### 5.9.3 Ypl158c bei Cln2-Überexpression

Nach den letzten Erkenntnissen stellte sich die Frage, wie Ypl158c lokalisiert, wenn die Cytokinese verhindert wird. Dies kann durch eine Überexpression von *CLN2* erreicht werden, da die Cytokinese dadurch gestört wird. Diese Zellen zeigen ein hyperpolarisiertes Wachstum mit langen Knospen (Benton *et al.*, 1997; Lew *et al.*, 1993a; Lew *et al.*, 1993b).

Für diesen Versuch wurde der Stamm W5849 (*YPL158c-MYC13-HisMX6 pGAL-CLN2-HA3-LEU2*), der Myc-epitopmarkiertes Ypl158c und ein HA-epitopmarkiertes Cln2 unter der Kontrolle des *GAL*-Promotors enthielt, hergestellt. Dazu wurden die beiden Stämme W4804 (*YPL158c-MYC13-HisMX6*) und W2914 (*pGAL-CLN2-HA3-LEU2*) miteinander gekreuzt und ein entsprechender haploider Nachkomme nach der Tetradenvereinzlung ausgewählt.

Die toxische Überexpression des *CLN2* Gens, (Abbildung 5.21 A), wurde durch 2 % Galaktose induziert. Nach drei Stunden Überexpression des *CLN2* Gens konnte man in der Immunfluoreszenz beobachten, dass die Zellen elongierte Knospen gebildet hatten (Abbildung 5.21 B). Sie zeigten ein hyperpolarisiertes Wachstum. In der Lokalisation von Ypl158c waren keine Unterschiede zum Wildtyp festzustellen. Ypl158c konnte weiterhin am Knospenhals nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden die Mengen an vorhandenem Ypl158c Protein und Cln2 in der Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 5.21 C). Die Menge an Cln2 hatte stark zugenommen und zeigte deutlich die Überexpression des Gens, wohingegen die Menge an Ypl158c gleich geblieben war und durch die Überexpression von *CLN2* nicht beeinflusst wurde. Das Verhindern der Cytokinese verhinderte somit nicht die Lokalisation des Proteins Ypl158c.



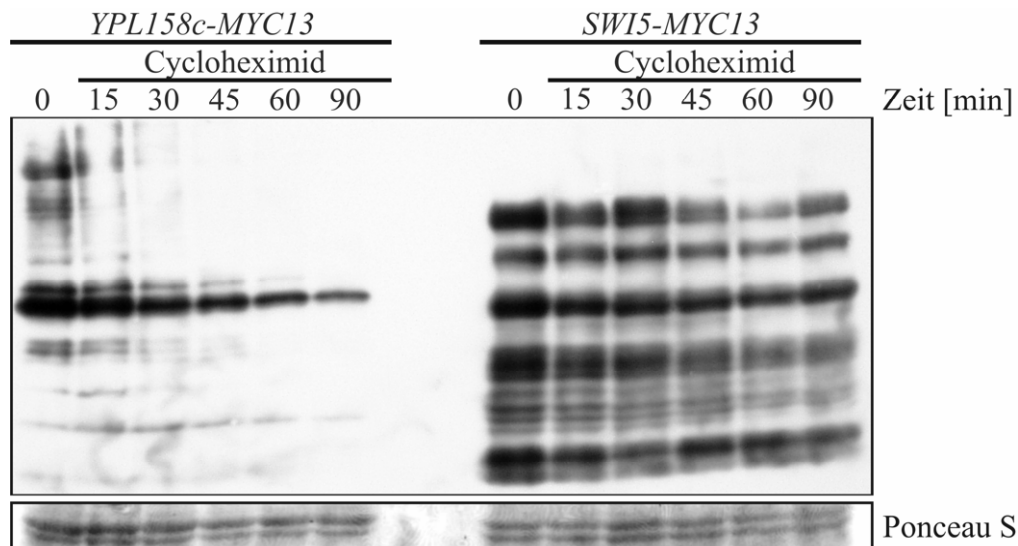
**Abbildung 5.21 Nachweis von Ypl158c bei Überexpression von Cln2**

**A)** Verdünnungsreihen der Stämme K699 (Wildtyp), W2914 (*pGAL-CLN2-HA3-LEU2*), W4804 (*YPL158c-MYC13-His3MX6*) und W5849 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 pGAL-CLN2-HA3-LEU2*) auf Vollmedium mit 2 % Glucose (XYD) und 2 % Galaktose (XYG) bei 30 °C. **B)** und **C)** Für die indirekte Immunfluoreszenz und die Western-Blot-Analyse wurden die Stämme W4804 und W5849 bei 25 °C in Vollmedium mit 2 % Raffinose (XYR) kultiviert. Bei Erreichen einer  $OD_{600} = 0,6$  wurde ein Teil der Zellen für die Immunfluoreszenz und die Western-Blot-Analyse geerntet. Anschließend wurden 2 % Galaktose zum Medium gegeben, um die Expression von Cln2 vom *GAL*-Promotor zu induzieren. Es wurden sofort wieder Zellen für die Immunfluoreszenz und die Western-Blot-Analyse geerntet (0 h). Die Kulturen wurden weiter bei 25 °C kultiviert. Danach wurden nach 1 h und 3 h Zellen für die Immunfluoreszenz und die Western-Blot-Analyse geerntet. In der Western-Blot-Analyse erfolgte der Nachweis von Ypl158c-Myc13 mit 9E10 und Cln2-HA3 mit 12CA5. Die Färbung der Membran mit Ponceau S zeigte in der Spur 1 (XYR) des Stammes W4804 eine höhere Proteinbeladung als in den drei folgenden. Ansonsten waren die Gele gleichmäßig beladen. Die Zellen für die Immunfluoreszenz wurden 30 min bei RT mit Formaldehyd fixiert. Ypl158c-Myc13 wurde mit 9E10 und Anti-Maus-Alexa488 Sekundäntikörper sichtbar gemacht. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Hier dargestellt sind die Zellen nach 3 h *CLN2*-Überexpression.

**5.10 Ypl158c ist instabil**

Da, wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt (Abbildung 5.19 und Abbildung 5.20), neben der Transkription von *YPL158c* (Spellman *et al.*, 1998) auch die Proteinmengen über den Zellzyklus stark variieren, lag die Vermutung nahe, dass Ypl158c sehr instabil ist und schnell degradiert wird. Außerdem konnte in der N-terminalen Region (Aminosäuren 57 – 100) der Ypl158c-Aminosäuresequenz ein potentiell PEST-Motiv identifiziert werden (Quelle: <http://www.at.embnnet.org/toolbox/pestfind/>), die das Protein zum proteasomalen Abbau prädestiniert (Abbildung 5.24). Bei PEST-Motiven handelt es sich um Regionen, die reich an Resten der Aminosäuren Prolin, Glutamat, Serin und Threonin sind. Diese Regionen werden häufig von Lysin- oder Argininresten flankiert (Rechsteiner *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 1986).

Um die Instabilität des Proteins zu prüfen wurde ein Stamm mit Myc-epitopmarkiertem Ypl158c einem Cycloheximid-Abschaltexperiment unterzogen. Als Vergleich wurde Myc-epitopmarkiertes Swi5 herangezogen. Cycloheximid ist ein Translationsinhibitor und verhindert die Proteinneusynthese. Dies ermöglicht den zeitlichen Verlauf der Proteindegradation zu beobachten.



**Abbildung 5.22 Proteinestabilität von Ypl158c und Swi5 im Cycloheximid-Abschaltexperiment**

Die Stämme W4592 (*YPL158c-MYC13-His3MX6*) und W4830 (*SWI5-MYC13-URA3*) wurden bei 25 °C in XYD Medium kultiviert. Bei Erreichen einer  $OD_{600} = 0,6$  bzw. 1,2 wurde Cycloheximid in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zum Medium hinzugegeben. Anschließend wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen (0 min: vor Zugabe von Cycloheximid). In der Western-Blot-Analyse wurden Ypl158c-Myc13 und Swi5-Myc13 mit 9E10 nachgewiesen. Eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung der Membran mit Ponceau S sicher gestellt.

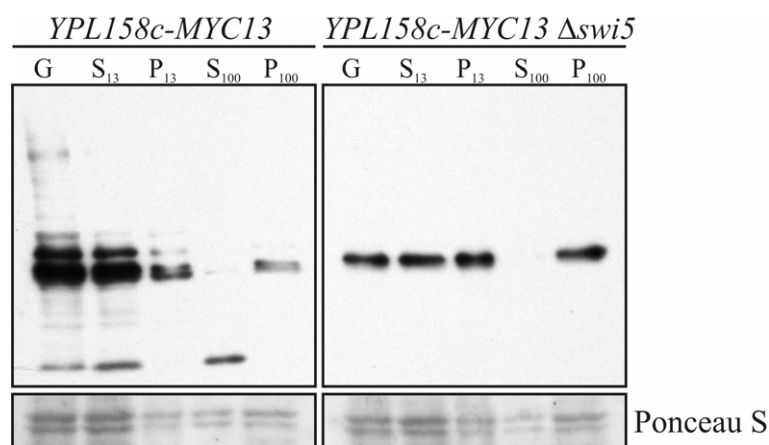
82 |

In diesem Experiment ist zu erkennen (Abbildung 5.22), dass das Ypl158c-Protein sehr instabil und schon nach 30 min kaum noch nachzuweisen war. Verglichen dazu war das Abbauprodukt, das bei der Aufarbeitung entstand, stabiler, wenn auch hier die Menge, gemessen anhand der Signalstärke, deutlich abnahm. Der Transkriptionsfaktor Swi5 hingegen war um ein Vielfaches stabiler.

### 5.11 Ypl158c ist an größere Strukturen gebunden

Da Ypl158c am Knospenhals lokalisiert, sollte durch das nächste Experiment geprüft werden, ob es dort entweder direkt oder auch indirekt an die Membran assoziiert ist. Dazu wurde eine Zellfraktionierung mittels differentieller Zentrifugation mit den Stämmen W4592 (*YPL158c-MYC13-His3MX6*) und W4648 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 swi5Δ::natMX4*) durchgeführt. Dabei werden Zellbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften (Größe, Dichte) in aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten aufgetrennt. Das erzeugte Zelllysate wurde durch einen ersten kurzen Zentrifugationsschritt von nicht lysierten Zellen

und Kernen befreit. Der Überstand wurde als Gesamtlysate (G) in einem zweiten Zentrifugationsschritt weiter aufgetrennt. Die Pellet-Fraktion (P<sub>13</sub>) nach dieser niedertouriger Zentrifugation enthielt größere Membranfragmente und Organellen. Der gewonnene Überstand (S<sub>13</sub>; engl. *supernatant*) wurde einem letzten Zentrifugationsschritt unterzogen. Dieser Überstand (S<sub>100</sub>) enthielt alle löslichen Zellbestandteile, das Pellet (P<sub>100</sub>) Plasmamembran, Ribosomen und microsomale Fragmente. Proben aller Überstände und Pellets wurden in der Western-Blot-Analyse untersucht.



**Abbildung 5.23** Nachweis von Ypl158c nach differentieller Zentrifugation in Wildtyp und *swi5Δ*

Die Stämme W4592 (*YPL158c-MYC13-His3MX6*) und W4648 (*YPL158c-MYC13-His3MX6 swi5Δ::natMX4*) wurden bei 25 °C in XYD Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Anschließend wurden sie in Puffer 3-D aufgeschlossen und das Gesamtlysate (G) mehreren Zentrifugationsschritten unterzogen. Proben der gewonnenen Überstände (G, S<sub>13</sub>, S<sub>100</sub>) und Pellets (P<sub>13</sub>, P<sub>100</sub>) wurden anschließend in der Western-Blot-Analyse untersucht. Hierbei wurde Ypl158c-Myc13 mit 9E10 nachgewiesen. Die Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung mit Ponceau S sichtbar gemacht.

In Abbildung 5.23 ist zu erkennen, dass Ypl158c in Wildtyp-Zellen sich schon bei geringeren Zentrifugalkräften pelletieren ließ (P<sub>13</sub>), aber ein erheblicher Anteil noch im Überstand verblieb (S<sub>13</sub>). Dieser konnte jedoch im nächsten Zentrifugationsschritt sedimentiert werden (P<sub>100</sub>). Auffällig war, dass auch hier das Protein in seiner vollen Länge kaum nachzuweisen war, was seiner hohen Instabilität zuzuschreiben ist. Sowohl in Wildtyp als auch in *swi5Δ* Zellen konnte das Degradationsprodukt von Ypl158c bei nieder- und hochtouriger Zentrifugation sedimentiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Ypl158c an größere

Strukturen assoziiert ist, was als Hinweis auf eine Membranassoziation gewertet werden kann. Außerdem konnte beobachtet werden, dass ein kleines C-terminales Fragment des Proteins (ca. 65 kDa) nicht zu sedimentieren war. Dies weist darauf hin, dass Ypl158c N-terminal zu diesem löslichen C-terminalen Fragment eine Region besitzt, die für die Assoziation an größere Strukturen und somit für die Lokalisation verantwortlich ist.

## 5.12 Phänotypen und Lokalisation verkürzter Ypl158c-Konstrukte

Die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation gaben einen Hinweis darauf, dass es im N-terminalen Bereich des Proteins Ypl158c eine Region geben muss, die für die Lokalisation des Proteins am Knospenhals verantwortlich ist, da ein C-terminales Fragment sich nicht sedimentieren ließ und somit auch an keine größeren Strukturen gebunden zu sein scheint. Betrachtet man zusätzlich den Sequenzvergleich (Abbildung 5.24) des Proteins aus verschiedenen Hefen, kann man mehrere stark konservierte Bereiche erkennen. Aus diesen Beobachtungen heraus ergab sich die Frage, ob Lokalisation und Funktion verschiedenen Bereichen des Proteins zugeordnet werden können. In welcher Beziehung stehen die Funktion und Lokalisation des Proteins zueinander?

84 |

Um diese Fragen beantworten zu können, wurden verschiedene C- und N-terminale Verkürzungen von *YPL158C* hergestellt (Abbildung 5.25). Dabei wurden die konservierten Bereiche des Proteins berücksichtigt. Die verschiedenen Konstrukte wurden N-terminal mit einem Myc3-Epitop fusioniert. Für eine konstitutive Expression der Verkürzungen wurde der *TEF2*-Promotor gewählt. Den N-terminalen Verkürzungen wurde vor die Sequenz ein *ATG*-Startcodon angefügt, den C-terminalen Verkürzungen nach der Sequenz ein *TAA*-Stopcodon. Alle Konstrukte wurden in das *ARS/CEN*-Plasmid pRS316 kloniert und anschließend in die entsprechenden Hefestämme transformiert.

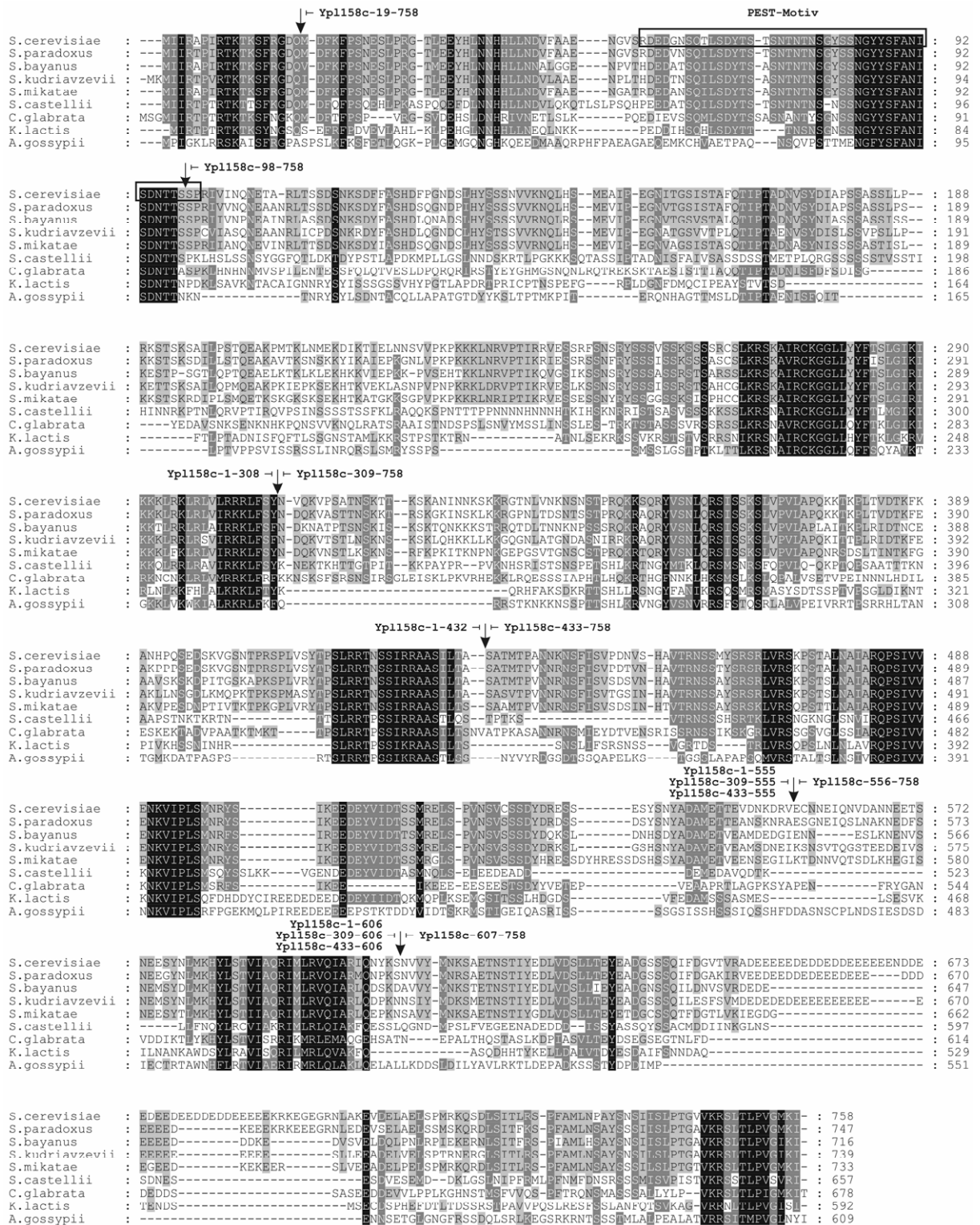
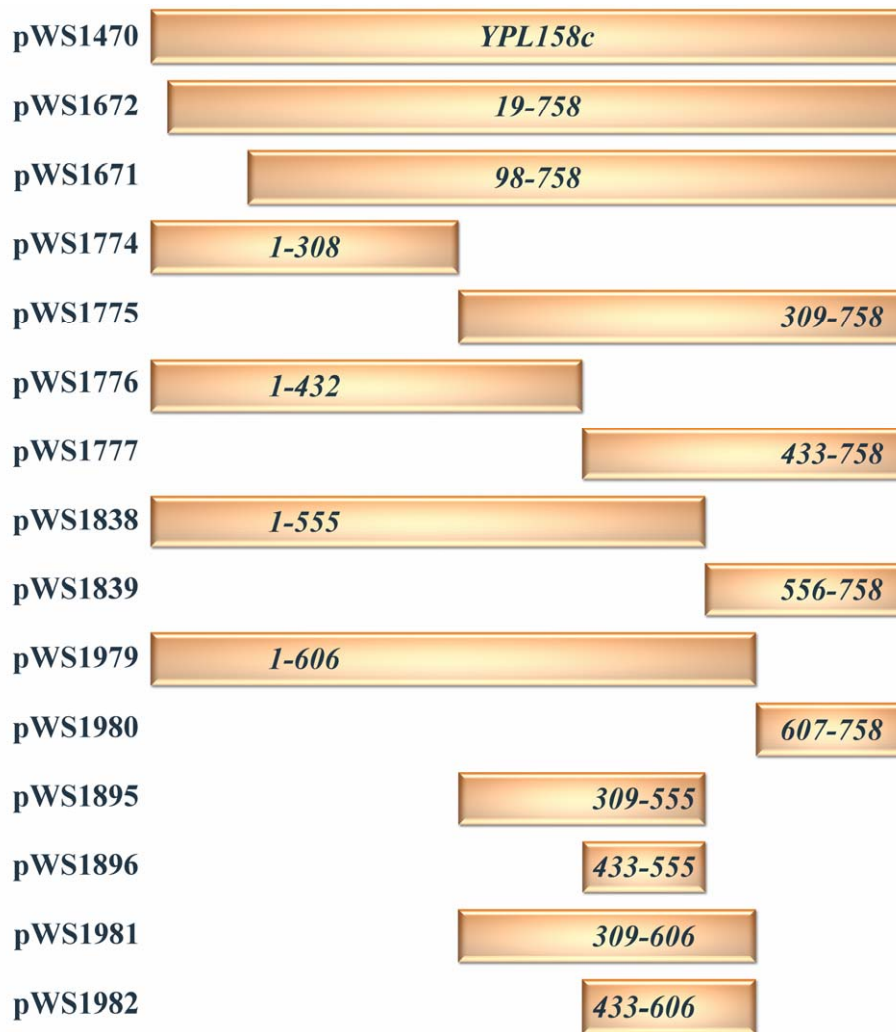


Abbildung 5.24 Multipler Sequenzvergleich von Yp1158c mit orthologen Proteinen ausgewählter Hefen  
Herstellte C- und N-terminale Verkürzungen von Yp1158c und das PEST-Motiv sind in der Sequenz vermerkt.

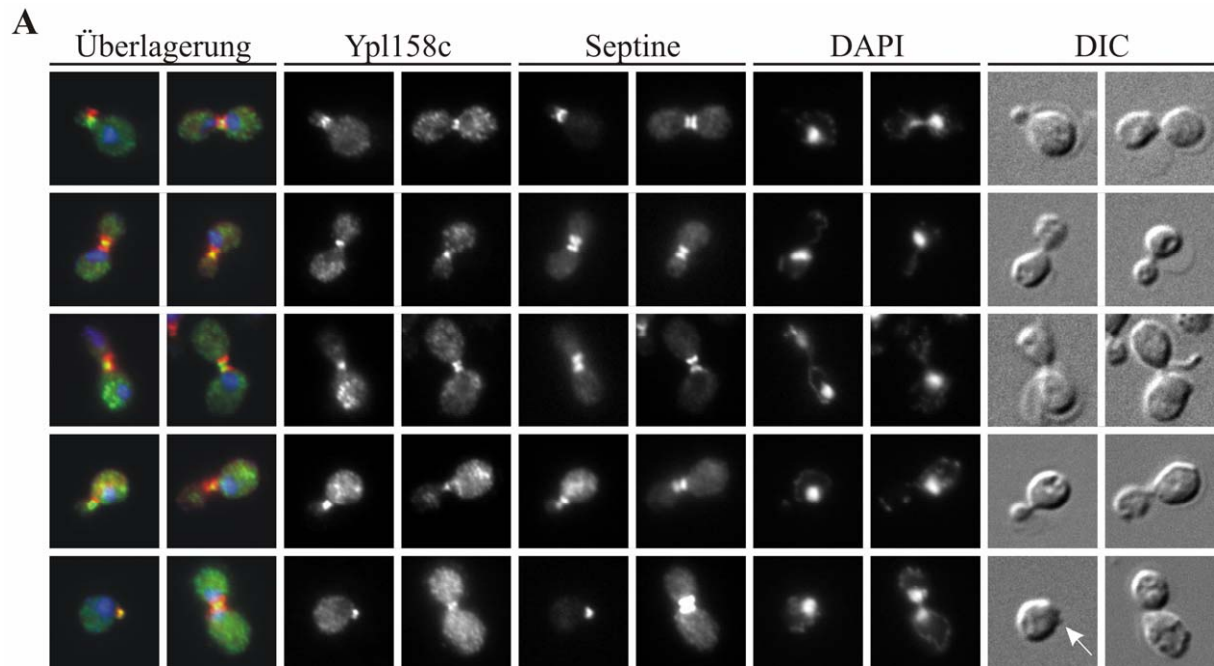


**Abbildung 5.25 Schematische Darstellung hergestellter C- und N-terminaler Verkürzungen des Ypl158c Proteins**

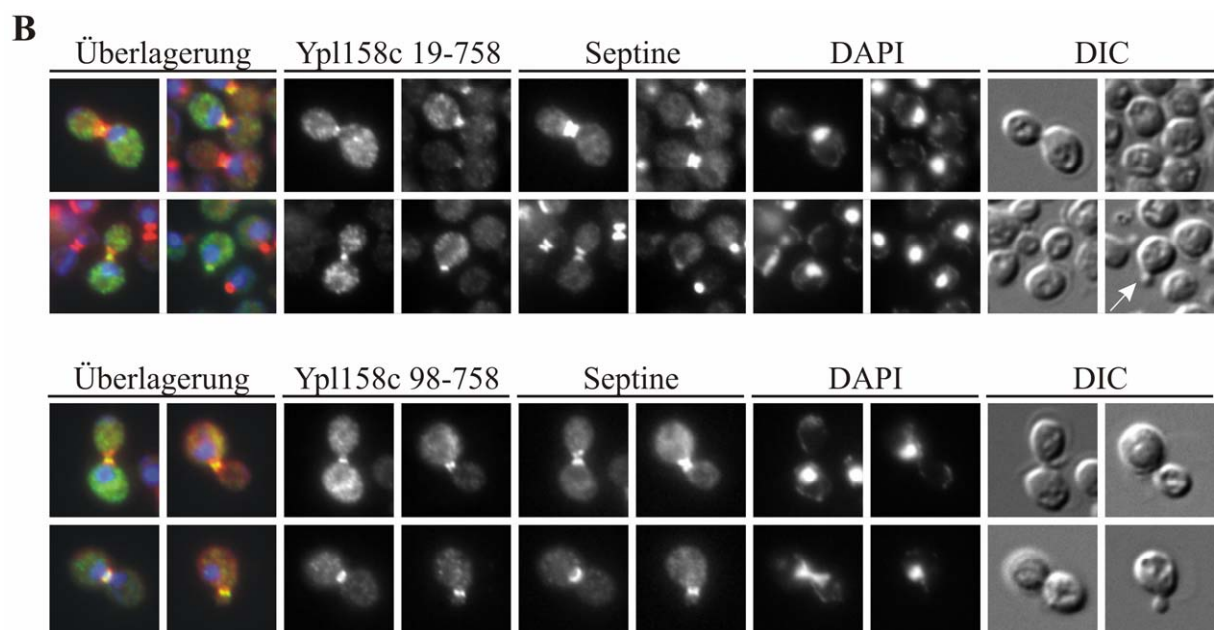
Hier angegeben sind die Aminosäuren, die das jeweils verkürzte Protein einschließt. Alle verkürzten Proteine sind N-terminal mit einem Myc3-Epitop fusioniert. Die konstitutive Expression steht unter der Kontrolle des *TEF2*-Promotors. Alle Konstrukte wurden in das *ARS/CEN*-Plasmid pRS316 kloniert. Daraus ergaben sich die Plasmide pWS1470 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1*), pWS1671 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-98-758-tCYC1*), pWS1672 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-19-758-tCYC1*), pWS1774 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-1-308-tCYC1*), pWS1775 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-309-758-tCYC1*), pWS1776 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-1-432-tCYC1*), pWS1777 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-433-758-tCYC1*), pWS1838 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-1-555-tCYC1*), pWS1839 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-556-758-tCYC1*), pWS1895 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-309-555-tCYC1*), pWS1896 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-433-555-tCYC1*), pWS1979 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-1-606-tCYC1*), pWS1980 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-607-758-tCYC1*), pWS1981 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-309-606-tCYC1*) und pWS1982 (*pTEF2-MYC3-YPL158c-433-606-tCYC1*).

### 5.12.1 Lokalisation am Knospenhals

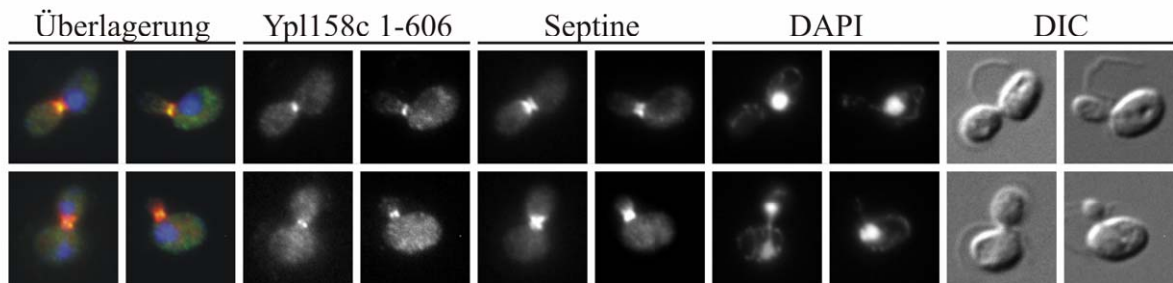
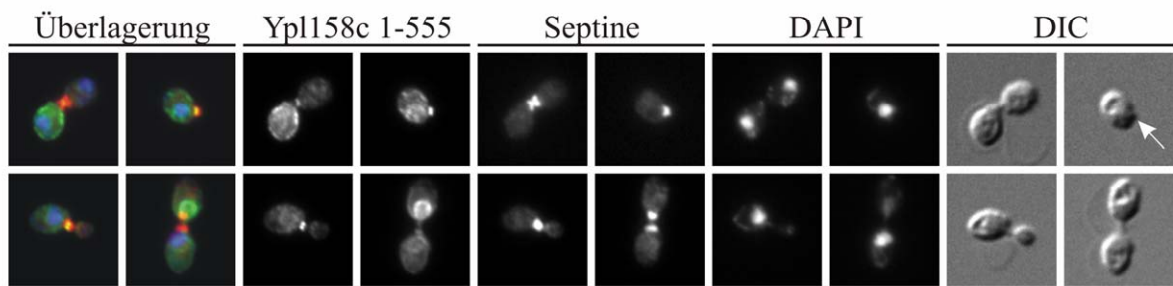
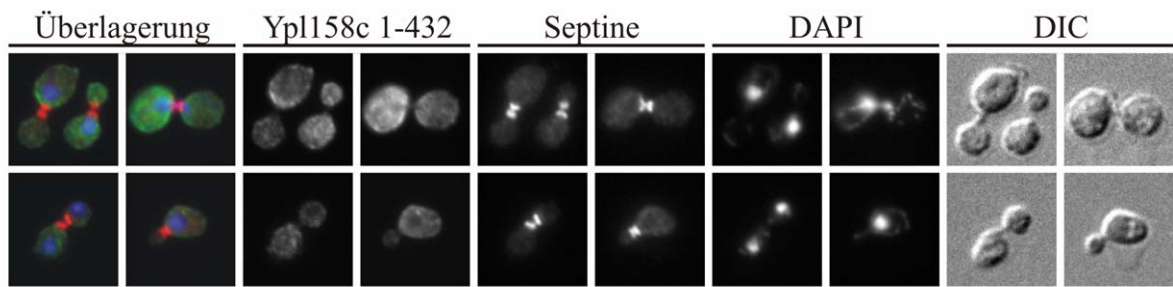
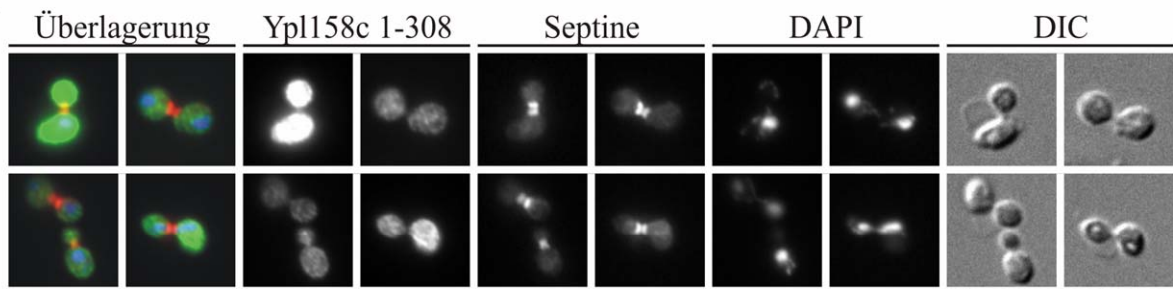
Um die Region einschränken zu können, die für die Lokalisation am Knospenhals verantwortlich ist, wurde die hergestellte Subklon-Kollektion (pWS1470, pWS1671, pWS1672, pWS1774, pWS1775, pWS1776, pWS1777, pWS1838, pWS1839, pWS1895, pWS1896, pWS1979, pWS1980, pWS1981 und pWS1982) in einen Wildtyp transformiert und in der indirekten Immunfluoreszenz untersucht.



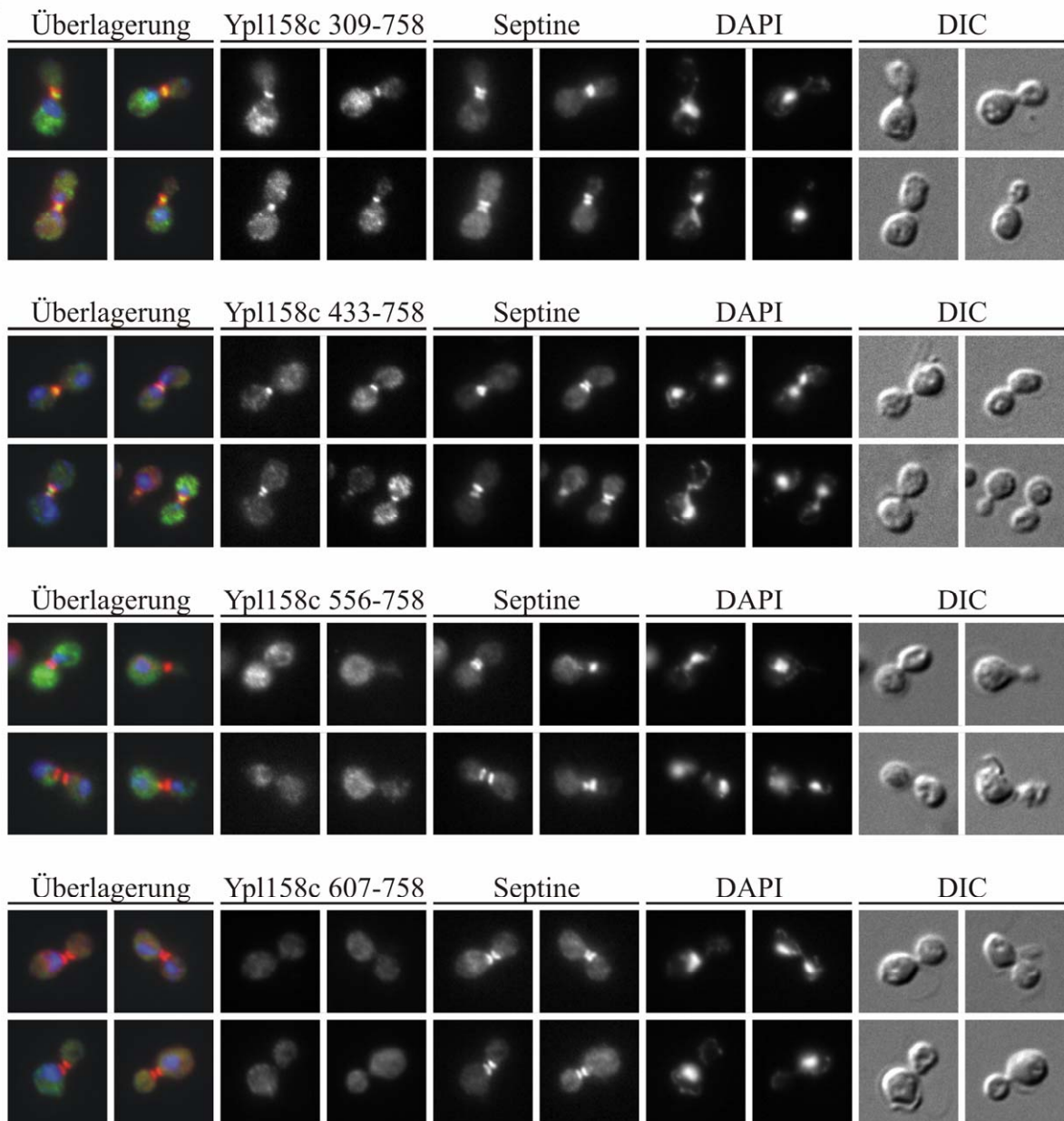
| 87

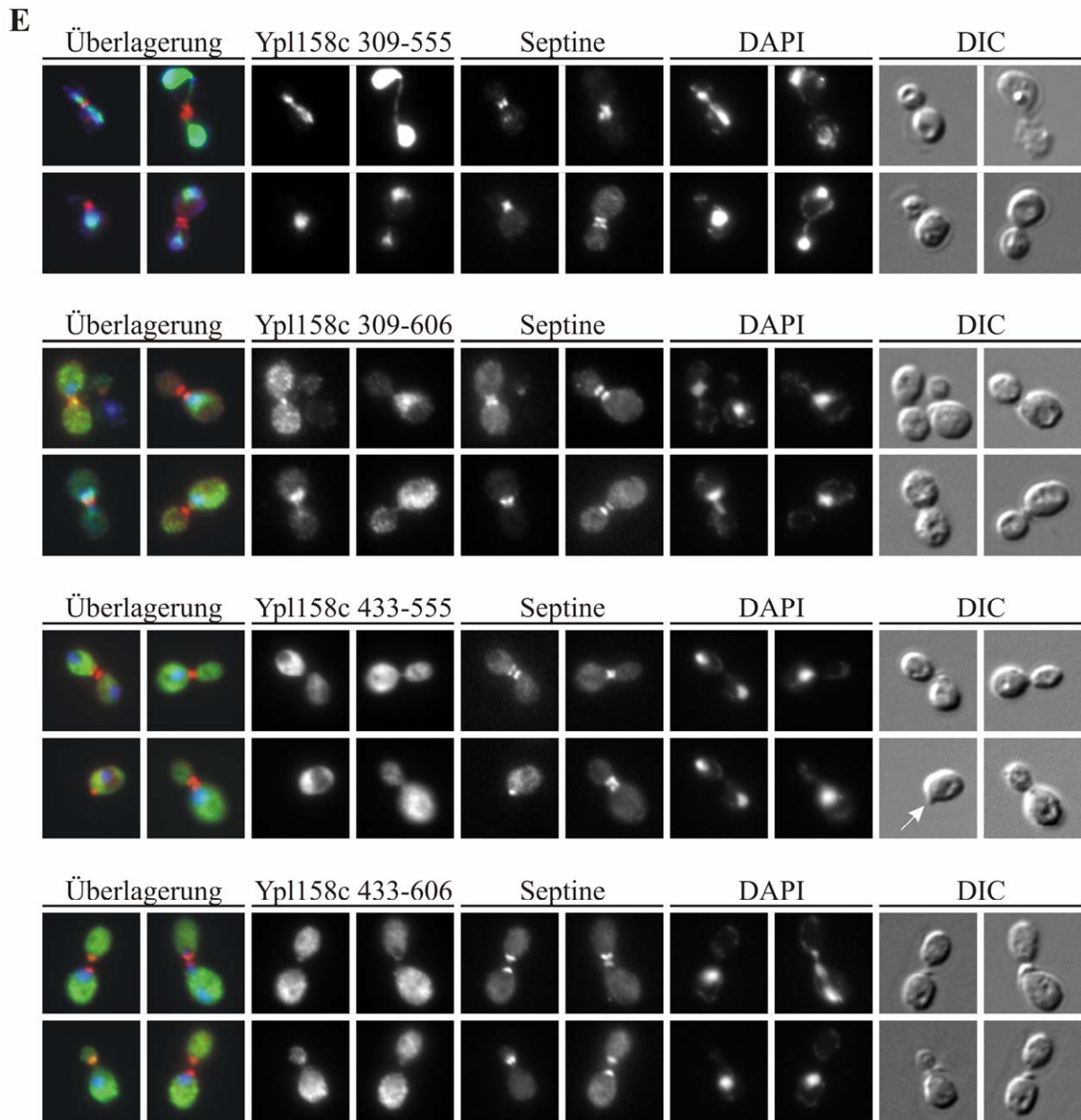


C



D





90 |

**Abbildung 5.26 Nachweis der verkürzten Ypl158c-Konstrukte in der indirekten Immunfluoreszenz**

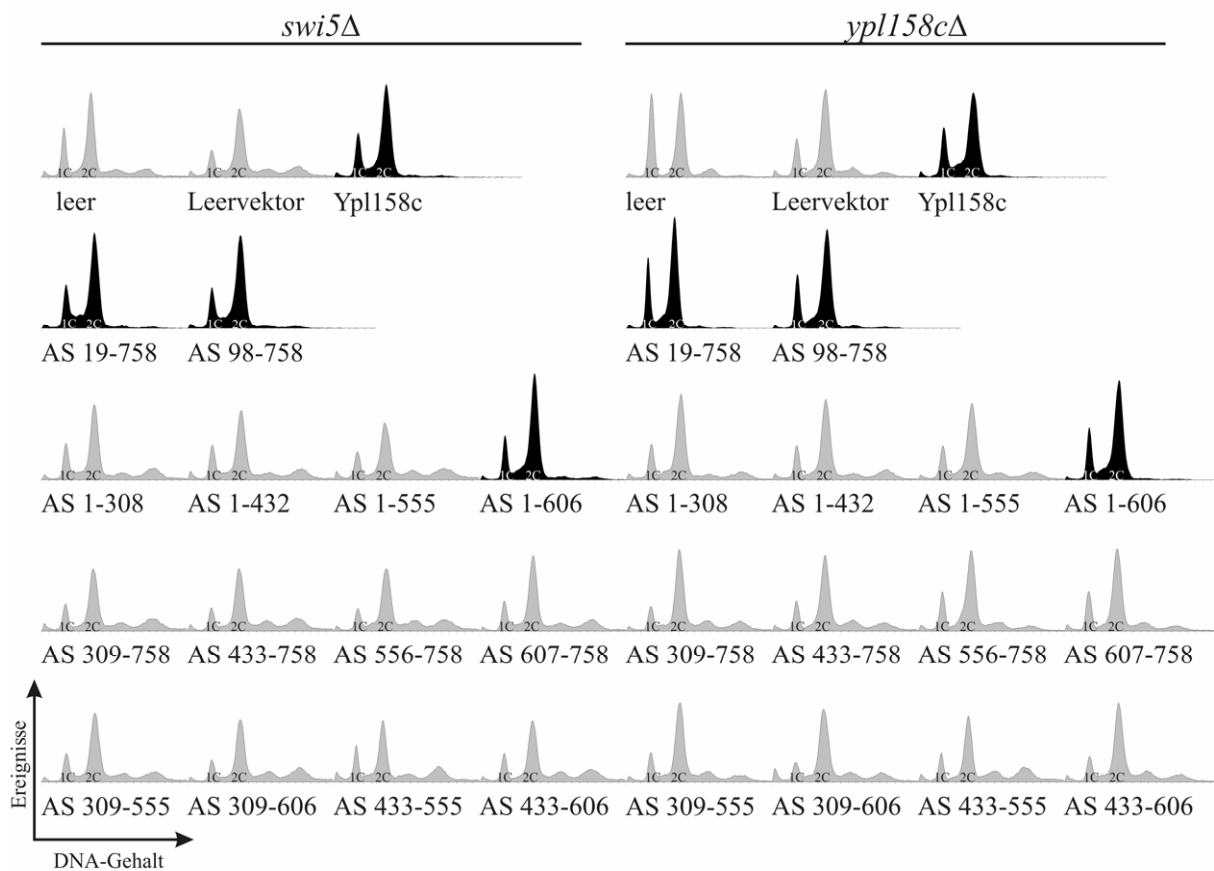
Für die Immunfluoreszenz wurde ein Wildtyp mit der hergestellten Subklon-Kollektion transformiert. Die Transformanten wurden in SD-Ura bei 25 °C kultiviert, in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und 10 min mit Formaldehyd bei RT fixiert. Die Myc3-Ypl158c-Verkürzungen wurden mit 9E10 und Anti-Maus-Alexa488 Sekundärantikörper und die Septine (Cdc11) mit Anti-Cdc11 (y-415) und Anti-Kaninchen-Alexa546 Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Eine gerade entstehende, sehr kleine Knospe ist mit einem Pfeil markiert. Die Konstrukte wurden in der Abbildung wie folgt zusammengefasst: **A)** Ypl158c in voller Länge, **B)** kurze N-terminale Verkürzungen, **C)** C-terminale Verkürzungen, **D)** N-terminale Verkürzungen, **E)** sowohl N- als auch C-terminale Verkürzungen.

Das volle Länge Ypl158c von Plasmid pWS1470 diente als Kontrolle und lokalisierte wie erwartet am Knospenhals (Abbildung 5.26 A). Die kurzen N-terminalen Verkürzungen Ypl158c-19-758 und Ypl158c-98-758 (pWS1671 und pWS1672) konnten ebenfalls am Knospenhals nachgewiesen werden (Abbildung 5.26 B). Bei den C-terminal verkürzten Konstrukten (Abbildung 5.26 C) konnte man feststellen, dass weder die Verkürzungen Ypl158c-1-308 noch Ypl158c1-432 (pWS1774 und pWS1776) am Knospenhals lokalisierten. Das Immunfluoreszenz-Signal war entweder sehr schwach bis nicht vorhanden oder bei starker Expression des Konstrukts im gesamten Cytoplasma verteilt. Die Verkürzung Ypl158c-1-555 (pWS11838) zeigte eine Lokalisation am Knospenhals. Außerdem konnte ein Signal rund um den Kern ausgemacht werden. Die C-terminale Verkürzung Ypl158c-1-606 (pWS1979) lokalisierte wie das volle Länge Protein am Knospenhals. Die N-terminalen Verkürzungen Ypl158c-309-758 und Ypl158c-433-758 zeigten eine Lokalisation am Knospenhals (pWS1775 und pWS1777), die Verkürzungen Ypl158c-556-758 (pWS1839) und Ypl158c-607-758 (pWS1980) jedoch nicht (Abbildung 5.26 D). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass zwischen den Aminosäuren 433 und 606 der Bereich liegt, der das Protein an den Knospenhals bringt. Dass dieser Bereich aber alleine nicht hinreichend für die Lokalisation war, zeigten die im folgenden beschriebenen Konstrukte (Abbildung 5.26 E). Die sowohl C- als auch N-terminale Verkürzung Ypl158c-309-555 (pWS1895) zeigte ein starkes Signal, das mit dem Kernsignal überlagerte. Die Verkürzung Ypl158c-309-606 (pWS1981) zeigte ebenfalls keine Lokalisation am Knospenhals, jedoch auch manchmal ein Signal, das das Kernsignal umgab. Die Verkürzungen Ypl158c-433-555 und Ypl158c-433-606 (pWS1896 und pWS1982) zeigten ebenfalls keine Lokalisation am Knospenhals, sondern ein Immunfluoreszenz-Signal im Cytoplasma. Das Auftreten der perinukleären Signale ist noch unverstanden. Festzuhalten bleibt folglich, dass es zwischen den Aminosäuren 433 und 606 einen Bereich gibt, der für die Lokalisation des Proteins Ypl158c am Knospenhals notwendig aber alleine nicht hinreichend ist.

| 91

### 5.12.2 Eine Region von AS 98 – 606 behebt den Defekt in der Cytokinese

Die Durchflußzytometrie zeigte in vorangegangenen Experimenten, dass eine Deletion in *YPL158c* bzw. *SWI5* eine Störung in der Cytokinese und Zellseparation hervorruft. Es sollte nun geprüft werden, ob und welche Verkürzungen des Proteins diesen Defekt supprimieren können. Dazu wurde die Subklon-Kollektion in die haploiden Nachkommen *ypl158cΔ* und *swi5Δ* aus einer Kreuzung von W4275 (*slt2Δ::natMX4*) mit W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) und W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) (siehe Abbildung 5.1) transformiert und in der Durchflußzytometrie



**Abbildung 5.27 Durchflusszytometrie bei konstitutiver Expression von C- bzw. N-terminalen Verkürzungen von YPL158c unter der Kontrolle des TEF2-Promotors in ypl158cΔ und swi5Δ Zellen**

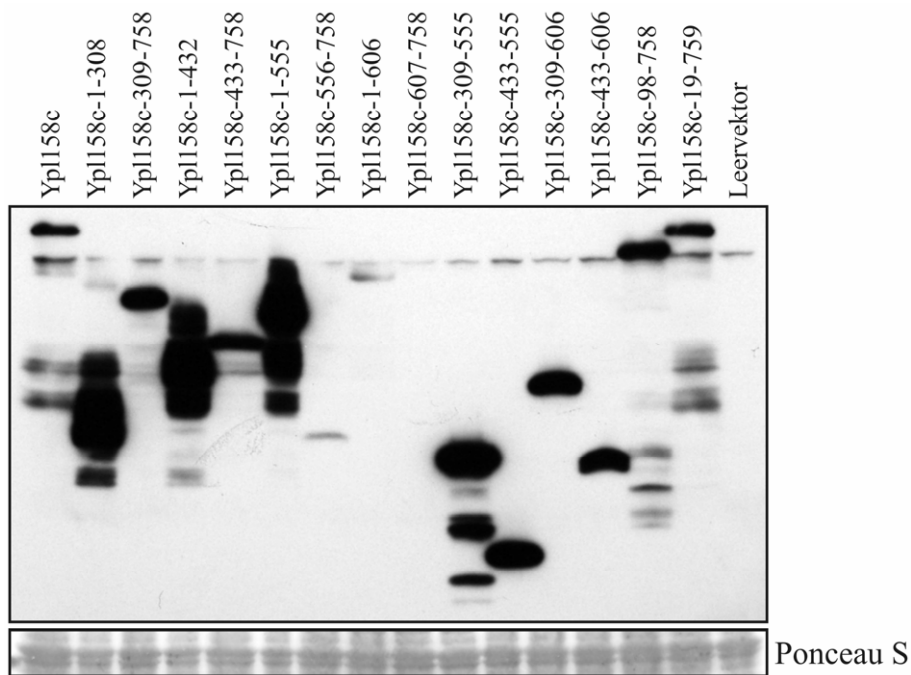
Für die Durchflusszytometrie wurden die haploiden Nachkommen *ypl158cΔ* und *swi5Δ* aus einer Tetrade der Kreuzung W4275 (*slt2Δ::natMX4*) x W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) und W4275 x W5854 (*ypl158cΔ::kanMX4*) ausgewählt (Abbildung 5.1) und mit der hergestellten Subklon-Kollektion transformiert. Als Kontrolle diente zum einen der untransformierte Nachkomme und ein Nachkomme, transformiert mit dem Leervektor (pWS1428, *pTEF2-MYC3-tCYC1*). Die Transformanten wurden in SD-Ura, die untransformierten Nachkommen in SD++ bei 25 °C kultiviert, in der in exponentiellen Wachstumsphase geerntet und mit Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit Sytox Green. Fehlende Suppression ist durch graue DNA-Profile dargestellt, Suppression durch schwarze. Die Positionen der begrenzenden Aminosäuren (AS) der Konstrukte sind in der Abbildung beschrieben.

auf ihr DNA-Profil hin analysiert. Als Kontrolle diente zum einen der untransformierte Nachkomme und ein Nachkomme, transformiert mit einem leeren Plasmid (pWS1428, *pTEF2-MYC3-tCYC1*), das sich nur durch die fehlende *YPL158C*-Sequenz von der Kollektion unterschied. Die durchflusszytometrische Auswertung (Abbildung 5.27) führte zu folgendem Ergebnis. Untransformierte Deletionsmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* sowie mit pWS1428 transformierte Zellen zeigten deutlich einen DNA-Gehalt größer als 2 C. Die meisten der Ypl158c-Verkürzungen konnten diesen Defekt in der Cytokinese und Zellseparation nicht supprimieren. Es gab letztlich nur drei verkürzte Versionen neben dem volle Länge Protein *YPL158c*, die im DNA-Profil dem des Wildtyps entsprachen, *YPL158c-19-758*, *YPL158c-98-758* und *YPL158c-1-606* (entsprechend pWS16772, pWS1671 und pWS1979). Es war also eine Region von Aminosäure 98 bis 606 in der Lage, den Defekt der Deletionsmutanten *swi5Δ* und *ypl158cΔ* in der Cytokinese und Zellseparation zu beheben.

### 5.12.3 Die Ypl158c-Verkürzungen zeigen unterschiedliche Mengen in der Western-Blot-Analyse

Das endogene Protein Ypl158c zeigte eine hohe Instabilität. Um zu prüfen, ob diese Instabilität auch gegeben ist, wenn das Protein episomal von einem ARS/CEN-Plasmid konstitutiv exprimiert wird, wurden die transformierten haploiden Wildtyp-Nachkommen aus 5.12.1 in der Western-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 5.28).

Diese zeigte, dass die jeweiligen Ypl158c-Verkürzungen in unterschiedlichen Mengen auftraten. Das volle Länge Protein Ypl158c und die N-terminal verkürzten Proteine Ypl158c-19-758, Ypl158c-98-758, Ypl158c-309-758, Ypl158c-433-758, Ypl158c-556-758 und Ypl158c-607-758 (pWS1470, pWS1672, pWS1671, pWS1775, pWS1775, pWS1839 und pWS1980) sowie die C-terminale Verkürzung Ypl158c-1-606 (pWS1979) zeigten trotz gleicher Beladung der Spuren ein sehr viel schwächeres Signal als die entsprechenden C-terminalen Verkürzungen und waren bei normaler Antikörperverdünnung kaum nachzuweisen. Auffallend dabei war, dass gerade die Verkürzungen ein schwächeres Signal in der Western-Blot-Analyse zeigten, die in der Immunfluoreszenz am Knospenhals nachzuweisen waren. Ypl158c-607-758 bildete dabei eine nicht erklärbare Ausnahme. Es konnte ausgeschlossen werden, dass das Protein mit 152 Aminosäuren zu klein war, um nachgewiesen zu werden. Ypl158c-433-555 besteht aus 123 Aminosäuren und zeigte in der Western-Blot-Analyse ein starkes Signal.



**Abbildung 5.28 Nachweis der Ypl158c-Verkürzungen in der Western-Blot-Analyse**

94 |

Für die Western-Blot-Analyse wurde ein haploider Wildtyp Nachkomme aus der Tetrade der Kreuzung W4275 (*slt2Δ::natMX4*) x W5853 (*swi5Δ::kanMX4*) ausgewählt (Abbildung 5.1) und mit der hergestellten Subkolkollektion transformiert. Die Transformanden wurden in SD-Ura bei 25 °C kultiviert und in der in exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Die Myc3-Ypl158c-Verkürzungen wurden mit 9E10 nachgewiesen (Verdünnung 1:20). Eine gleichmäßige Beladung des SDS-Gels wurde durch eine Färbung mit Ponceau S sicher gestellt.

Aus den vorangegangenen Experimenten mit den verschiedenen Ypl158c-Konstrukten unterschiedlicher Länge konnten folgende Schlüsse gezogen werden. Für die Lokalisation des Proteins am Knospenhals ist ein Bereich zwischen den Aminosäuren 433 und 606 notwendig, jedoch alleine nicht hinreichend. Für die Funktion des Proteins Ypl158c, das Vorantreiben der Cytokinese und Zellseparation, konnte der Bereich auf die Aminosäuren 98 bis 606 eingegrenzt werden. Die Funktion des Proteins erfüllten dabei nur Ypl158c-Verkürzungen, die auch am Knospenhals lokalisieren konnten. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5.29 schematisch noch einmal zusammengefasst. Eine Auswertung im Wachstumstest der Doppelmutanten war leider nicht möglich, da diese Mutanten nach der Transformation mit den verkürzten Konstrukten keine reproduzierbar gleichförmig wachsenden Transformanden hervorbrachte.

		Lokalisation am Knospenhals	Cytokinese	Menge in Western-Blot-Analyse
pWS1470	<i>YPL158c</i>	ja	ja	wenig
pWS1672	<i>19-758</i>	ja	ja	wenig
pWS1671	<i>98-758</i>	ja	ja	wenig
pWS1774	<i>1-308</i>	nein	nein	sehr viel
pWS1776	<i>1-432</i>	nein	nein	sehr viel
pWS1838	<i>1-555</i>	ja/nein	nein	sehr viel
pWS1979	<i>1-606</i>	ja	ja	sehr wenig
pWS1775	<i>309-758</i>	ja	nein	wenig
pWS1777	<i>433-758</i>	ja	nein	wenig
pWS1839	<i>556-758</i>	nein	nein	sehr wenig
pWS1980	<i>607-758</i>	nein	nein	sehr wenig
pWS1895	<i>309-555</i>	nein	nein	viel
pWS1981	<i>309-606</i>	nein	nein	viel
pWS1896	<i>433-555</i>	nein	nein	viel
pWS1982	<i>433-606</i>	nein	nein	viel

**Abbildung 5.29 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Ypl158c-Verkürzungen**

Die Verkürzungen Ypl158c-19-758, Ypl158c-98-758, Ypl158c-309-758, Ypl158c-433-758 und Ypl158c-1-606 sind wie auch das Protein voller Länge in der Lage am Knospenhals zu lokalisieren. Die Verkürzungen Ypl158c-19-758, Ypl158c-98-758 und Ypl158c-1-606 konnten den Defekt in der Cytokinese und Zellseparation supprimieren und diese vorantreiben. In der Western-Blot-Analyse zeigten die verschiedenen Verkürzungen unterschiedliche Proteinmengen.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Swi5 beeinflusst Cytokinese und Zellseparation

Der Transkriptionsfaktor Swi5 spielt am Ende der Mitose eine wichtige Rolle, indem er zellzyklus-spezifisch die Transkription von Genen aktiviert, die am M/G1-Übergang und in der G1-Phase benötigt werden. Zu diesen Genen gehören beispielsweise *HO*, *SIC1*, *ASH1* und Gene, deren Genprodukte an der Zellwandbiogenese, Knospung und Cytokinese beteiligt sind, wie *EGT2* (Endoglucanase), *CHS1* (Chitinsynthase) und *CTS1* (Endochitinase). Er verbindet also den Abschluss der Mitose mit dem Beginn der G1-Phase. *SWI5* selbst wird ebenfalls im Verlauf des Zellzyklus reguliert. Seine Expression findet in der zweiten Hälfte des Zellzyklus (S, G2- und M-Phase) statt (Nasmyth *et al.*, 1987). Dabei verbleibt Swi5 bis zu seiner Aktivierung im Cytoplasma und tritt dann in der späten Anaphase in der Kern ein (Nasmyth *et al.*, 1990).

96 |

Die vorliegende Arbeit beleuchtete einen neuen Aspekt von Swi5. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *SWI5* den Zellen Probleme in der Cytokinese und Zellseparation bereitete, die sich in einer Färbung der Zellen mit ConA-FITC und in der durchflußzytometrischen Analyse visualisieren ließen (Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4). Dieser Defekt führte bei einem signifikanten Anteil der Zellen (9,6 %, Wildtyp < 1 %) zu einer stark verzögerten Cytokinese und Zellseparation. Dies äußerte sich durch Zellen, die eine neue Knospe gebildet hatten, obwohl die Trennung der Tochter- von der Mutterzelle noch nicht vollständig abgeschlossen war. Dabei waren jedoch nie mehr als vier Zellkörper in einem solchen Verbund zu beobachten. Der Grund für den beobachteten Defekt in der Cytokinese und Zellseparation könnte ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren sein, da Swi5 für die Expression mehrerer Cytokinese- und Zellseparationsgene wichtig ist. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ursache dafür alleine in der stark verringerten Menge des bis dahin unbeschriebenen Proteins Ypl158c begründet liegt. Transkriptionsstudien und ChIP-Analysen von Doolin *et al.* 2001 und Simon *et al.* 2001 zeigten, dass *YPL158c* in seiner Expression von Swi5, nicht aber von dessen verwandten Transkriptionsfaktor Ace2 aktiviert wird. Zudem besitzt *YPL158c* in seiner Promotorregion ausschließlich drei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Swi5 (Harbison *et al.*, 2004). Eine Deletion von *YPL158c* führte zu dem gleichen Phänotyp wie die Deletion von *SWI5*, einer stark verzögerten Cytokinese und Zellseparation (Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4). Dieses Ergebnis konnte in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Yves Barral (ETH Zürich) bestätigt werden, die

zeigen konnte, dass die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes in *ypl158cΔ* Mutanten erheblich langsamer von Statten ging als in Wildtyp (persönliche Mitteilung). Bei einer gleichzeitigen Deletion der Gene *SWI5* und *YPL158c* konnte keine Verstärkung der Defekte in der Cytokinese und Zellseparation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ausschlaggebend aber für die Behauptung, die stark reduzierte Menge von Ypl158c sei für die Defekte in der Cytokinese und Zellseparation verantwortlich war letztlich die Tatsache, dass sich die beschriebenen Beobachtungen alleine durch die Expression von *YPL158c* von einem Swi5-unabhängigen Promotor supprimieren ließen (Abbildung 5.7). Wurde Ypl158c konstitutiv vom *TEF2*-Promotor in den Deletionsmutanten *swi5Δ* oder *ypl158cΔ* exprimiert, fand die Cytokinese und Zellseparation ohne Verzögerung statt. Es konnten keine Zellen mehr beobachtet werden, die mehr als eine Knospe aufwiesen. Tochter- und Mutterzellen waren in der Lage sich zu trennen, bevor eine neue Knospe entstand. Offenbar konnte in Ypl158c eine Komponente der Cytokinese und Zellseparation gefunden werden, die eben diese Prozesse vorantreibt.

## 6.2 Aktivierung des Zellintegritätswegs

Die Zellwand, die während eines Zellzyklus verschiedenen Einflüssen ausgesetzt ist, steht unter stetiger Kontrolle des Zellintegritätswegs. Er reagiert auf Veränderungen der Zellmorphologie und kontrolliert dabei die Expression von Genen, die für Enzyme des Zellwandmetabolismus kodieren (Gustin *et al.*, 1998; Hohmann, 2002; Jung *et al.*, 1999). Der Zellintegritätsweg beinhaltet eine Kaskade aus MAP Kinasen, die das Signal, das von der Zellwand empfangen wird, schnell in die Zelle an seinen Bestimmungsort weiter leitet. Dies ermöglicht der Zelle, sich schnell an die veränderte Situation anzupassen. Das Herzstück dieser Kaskade ist die MAP Kinase Slk2. Sie steht am Ende dieser Kaskade, die die MEK Mkk1 und Mkk2 und die MEKK Bck1 umfassen und wird selbst durch Phosphorylierung aktiviert (Lee *et al.*, 1993). Die Deletion einer dieser Komponenten des Zellintegritätswegs führt zu Thermosensitivität (Irie *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1992). Dabei lässt sich die damit verbundene Zelllyse durch osmotischen Stabilisierung durch die Zugabe von 1 M Sorbitol unterdrücken (Cid *et al.*, 1995; Irie *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1996).

Diese Arbeit stellt nun einen zuvor unbekanntem Zusammenhang zwischen der Zellintegrität und dem Ende der Mitose her. Als erstes zeigte sich dieser in der synthetisch genetischen Interaktion der Gene *SWI5* und *SLT2*. Die Deletion beider Gene zur gleichen Zeit bewirkte eine Thermosensitivität der Zellen bei erhöhten Temperaturen. Dies war zum einen in der Tetradenanalyse sichtbar, bei der die Doppelmутanten deutlich kleinere Kolonien

hervorbrachten als die jeweiligen Einzelmutanten und der Wildtyp (Abbildung 5.1). Zum anderen konnte dies auch in einem Wachstumstest gezeigt werden, der ein deutlich eingeschränktes Wachstum der Doppelmutanten *swi5Δ slt2Δ* bei 37 °C beobachten ließ (Abbildung 5.2). Dabei konnte die Störung der Zellintegrität und die hervorgerufene Lyse der Zellen durch die Zugabe von 1 M Sorbitol in das Medium unterdrückt werden. Es hat sich gezeigt, dass Deletionsmutanten, die eine Deletion in *SWI5* tragen, einen funktionalen Zellintegritätsweg benötigen, um lebensfähig zu sein. Die Phosphorylierung von Slt2 und folglich die Aktivierung des Zellintegritätswegs in *swi5Δ* konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Abbildung 5.5). Die Frage, wie Swi5 Einfluss auf den Zellintegritätsweg nimmt, konnte auch hier mit *Ypl158c* beantwortet werden. Auch hier zeigte die Deletion von *YPL158c* die Phänotypen, die bei der Deletion von *SWI5* zu beobachten waren (Abbildung 5.1, Abbildung 5.2 und Abbildung 5.5). Und auch hier konnte die konstitutive Expression des Gens *YPL158c* von einem Swi5-unabhängigen Promotor die verursachten Probleme supprimieren (Abbildung 5.6 und Abbildung 5.8). Dabei ist auffällig, dass auch in Wildtyp die Phosphorylierung von Slt2 und die Aktivierung des Zellintegritätswegs durch die zusätzliche Expression von *YPL158c* vom *TEF2*-Promotor verringert werden kann. Im Hinblick auf die anfangs beschriebenen Defekte der *swi5Δ* und *yp1158cΔ* Mutanten in der Cytokinese und Zellseparation ist es nicht verwunderlich, dass der Signalweg der Zellintegrität in diesen Zellen aktiviert wird. Letztlich aktiviert er die Transkription von Genen, von denen viele für Zellwandproteine kodieren oder anders an der Zellwandbiogenese beteiligt sind (Levin, 2005). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass Mutanten, die eine Deletion von *SWI5* oder *YPL158c* und zusätzlich von *SLT2* tragen, einen noch größeren Anteil an Zellen aufweisen, die in ihrer Cytokinese gestört sind (Abbildung 5.3). Der Zellintegritätsweg unterstützt folglich Zellen bei der Cytokinese, die durch einen Mangel an *Ypl158c* in diesem Prozess Schwierigkeiten aufweisen.

## 6.3 Funktion des Knospenhalsproteins Ypl158c

### 6.3.1 Lokalisation

*Ypl158c* stellt das Bindeglied der Cytokinese und des Zellintegritätswegs dar. Seine Deletion bewirkt, dass die Zellen Defekte in der Cytokinese aufweisen und die Trennung der Knospen von der Mutterzelle sehr verzögert stattfindet (Abbildung 5.3 und Abbildung 5.4). Einen weiteren Hinweis auf die Rolle von *Ypl158c* gibt das zeitliche Auftreten des Proteins im Verlauf eines Zellzyklus. Dabei korreliert die verstärkte Synthese des Proteins mit dem Beginn der Cytokinese (Abbildung 5.19). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass das

Protein sehr instabil ist. Dies führt zu dem Schluss, dass es schnell degradiert wird, sobald seine Aufgabe erfüllt ist (Abbildung 5.22). Die Lokalisation des Proteins am Knospenhals (Abbildung 5.11) stützt ebenfalls die Hypothese, dass Ypl158c an der Cytokinese und Zellseparation beteiligt ist, da Proteine, die in diesen Phasen eine Rolle spielen, früher oder später in einem Zellzyklus auch am Knospenhals lokalisieren (Yeong, 2005). Ypl158c lokalisiert schon früh im Zellzyklus am Knospenhals und kann auch nach erfolgter Zellseparation dort noch nachgewiesen werden. Dieses Lokalisationsmuster konnte in der Arbeitsgruppe um Yves Barral mit einem GFP-epitopmarkierten Ypl158c ebenfalls gezeigt werden (persönliche Mitteilung). Die *Organelle Database* des Biowissenschaftlichen Instituts der Universität von Michigan, USA, unter der Leitung von Anuj Kumar (<http://organelledb.lsi.umich.edu/index.php>), beschreibt zusätzlich zur Lokalisation des Proteins am Knospenhals eine Lokalisation von Ypl158c im Kern. Es konnte in der Aminosäuresequenz des Proteins bei einer Motivsuche in der PROSITE-Datenbank ([http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan)) zwischen den Positionen 291 und 305 eine Kernlokalisationssequenz (NLS, engl. *nuclear localization signal*) ausgemacht werden. Zwei der hergestellten verkürzten Ypl158c-Konstrukte (Abbildung 5.26 E, Ypl158c-309-555 und Ypl158c-309-606) zeigten zwar in der indirekten Immunfluoreszenz eine Überlagerung mit dem Kernsignal. Allerdings ist die vorhergesagte NLS in der Aminosäuresequenz dieser Konstrukte nicht enthalten, so dass momentan weder sicher von einer Kernlokalisierung dieser Konstrukte ausgegangen werden noch eine Aussage über die Funktionalität der möglichen NLS getroffen werden kann. Eine Lokalisation von Ypl158c im Kern konnte zudem weder in einer indirekten Immunfluoreszenz (Abbildung 5.11) noch in einer GFP-Fluoreszenz des Yves Barral Labors beobachtet werden (persönliche Mitteilung).

| 99

### 6.3.2 Physikalische Interaktionen

Weitere Möglichkeiten, die aus der Sequenz des Proteins einen Hinweis auf die Funktion von Ypl158c geben sind eher spärlich. Es hat den Anschein, dass Ypl158c Ähnlichkeit zu Armadillo-Proteinen besitzt (Angabe aus SGD, SuperFamily SSF48371, Interpro IPR016024, Score/E-Value: 0,00027). In *S. cerevisiae* sind nur zwei Armadillo Proteine bekannt, Vac8 und Srp1. Das vakuoläre Membranprotein Vac8 verbindet die intrazelluläre Membran mit dem Aktincytoskelett. Srp1 ist ein Homologes zu Karyopherin  $\alpha$  und ist am Kernimport von Proteinen beteiligt. Armadillo Proteine sind durch ihre imperfekte Tandem-Wiederholung eines 42 Aminosäure-Sequenzmotivs, dem Armadillo (Arm) repeat (engl. für Wiederholung) gekennzeichnet (Peifer *et al.*, 1994). Diese Proteine teilen sich scheinbar eine konservierte

dreidimensionale Struktur. Ein einziger Arm-repeat besteht aus 3  $\alpha$ -Helices und diese Helices bilden wiederum eine Superhelix (Coates, 2003). Arm Proteine zeigen über die Arm-repeats zum einen Protein-Protein Interaktionen und zum anderen Interaktionen zum Aktincytoskelett. Diese Eigenschaften würden mit einer Funktion von Ypl158c in der Cytokinese übereinstimmen. Protein-Protein Interaktionen lassen sich vermuten, wenn man das Ergebnis der differentiellen Zentrifugation betrachtet, das zeigt, dass Ypl158c an größere Strukturen assoziiert ist (Abbildung 5.23). Zudem konnte in einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Yves Barral gezeigt werden, dass die Lokalisation des Proteins am Knospenhals in Abhängigkeit zur Lokalisation der Septine steht (persönliche Mitteilung). Interaktionen von Ypl158c mit dem Aktincytoskelett könnten ebenfalls in Betracht gezogen werden, da die Kontraktion des Aktin-Myosin-Ringes in *ypl158c* $\Delta$  verlangsamt ist. Weitere Hinweise auf eine mögliche Verbindung von Ypl158c mit Strukturen des Cytoskeletts ergeben sich aus einer Zwei-Hybridstudie (Wong *et al.*, 2007), in der eine Interaktion mit dem Kinesin verwandten Motorprotein Kip3, das in der späten Anaphase an der *Spindle midzone* zu beobachten ist (Hildebrandt *et al.*, 2000), gezeigt werden konnte. Genauere Zusammenhänge sind noch unklar, könnten in Zukunft jedoch weiter zur Aufklärung der Proteinfunktion von Ypl158c beitragen. Eine Suche nach weiteren Protein-Protein Interaktionspartnern im Rahmen dieser Arbeit mittels eines Zwei-Hybrid-Systems erbrachte keine weiteren Hinweise (Daten nicht gezeigt).

100 |

### 6.3.3 Genetische Interaktionen

Es können nicht nur physikalische Interaktionen Auskunft über die mögliche Funktion des Proteins geben, sondern auch genetische Interaktionen. Dabei bedient man sich der Tatsache, dass kongruente Genpaare, deren Genprodukte in einem gemeinsamen Reaktionsweg wirken, gemeinsame synthetisch genetische Interaktionspartner besitzen. Genetische Interaktionen und Übereinstimmungen in anderen Eigenschaften lassen eine Funktionsvorhersage bei uncharakterisierten Genen zu (Ye *et al.*, 2005). Das Gen der MAP Kinase *SLT2* zeigt viele genetische Interaktionen mit Genen verschiedenster Funktion. Unter ihnen sind auch Gene, deren Genprodukte eine Rolle in der Cytokinese und Zellseparation spielen und/oder am Knospenhals lokalisieren, wie beispielsweise *CHS3*, *CHS4*, *CHS5*, *CHS6*, *CDC12*, *MYO1*, *FKS1* und andere (Tabelle 5.1 und Tabelle 5.2). Auch *SWI5* und *YPL158c* spielen eine Rolle in der Cytokinese und Zellseparation und zeigen synthetische genetische Interaktionen mit *SLT2*. Eine genauere Einordnung von *YPL158c* in das Cytokinesgeschehen durch weitere genetische Interaktionen mit den genannten Genen war nicht möglich (Tabelle 5.2).

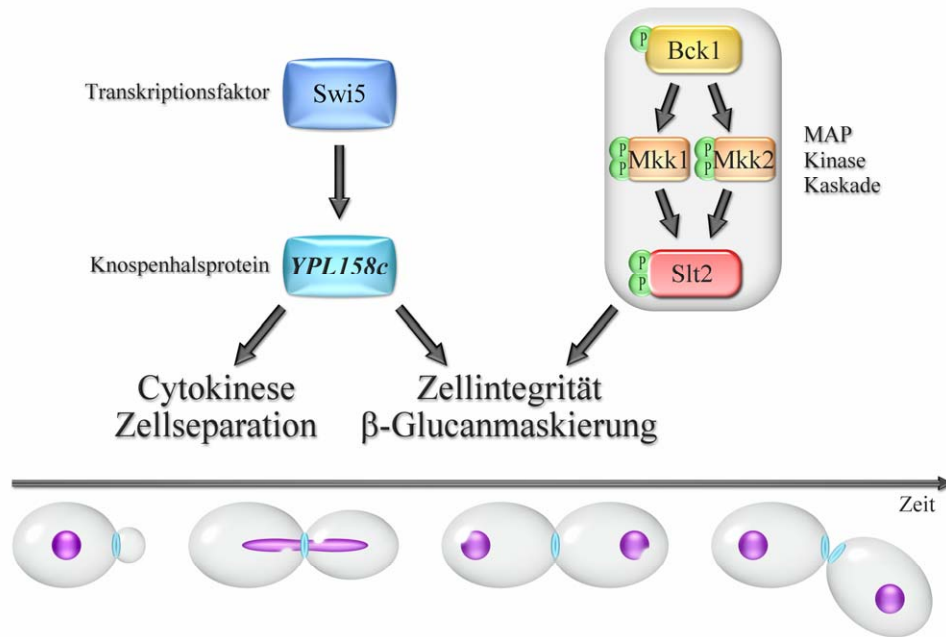
### 6.3.4 Beteiligung von Ypl158c an einem Netzwerk der $\beta$ -Glucanmaskierung

Das Immunsystem erkennt pathogene Pilze an ihrem  $\beta$ -Glucan, einem wirksamen proinflammatorischen Molekül, das in den Zellen in großen Mengen vorhanden ist. Das meiste davon ist jedoch unter einer Mannoproteinschicht verborgen und somit für den Wirt nicht zugänglich (Wheeler *et al.*, 2006). Die Arbeit von Wheeler & Fink beschäftigte sich mit der Frage, welche Mechanismen dieser Maskierung unterliegen und welche Auswirkungen ein Demaskieren für die Immunantwort bedeutet. Dabei konnten sie ein konserviertes genetisches Netzwerk aufdecken, das für ein Abschirmen des  $\beta$ -Glucans vor dem Immunsystem benötigt wird. Sie konnten zeigen, dass gerade an denjenigen Stellen, an denen ein Remodellieren der Zellwand stattgefunden hat (an Knospungsnarben, an Geburtsnarben und am Knospenhals) die Zellen für das Immunsystem am angreifbarsten sind. An diesen Stellen ist ein Schutz durch die Mannoproteinschicht am wenigsten gegeben. In manchen Deletionsmutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist der Schutz der Zelle durch die Mannoproteinschicht ebenfalls stark beeinträchtigt. Unter vielen anderen Proteinen konnten Wheeler & Fink dabei auch die Proteine Sl2 und Ypl158c identifizieren, die diese Architektur der Zellwand aufbauen und erhalten. Ypl158c ist somit mitverantwortlich dafür, eine die Zelle schützende Mannoproteinschicht aufzubauen.

| 101

### 6.3.5 Modell der Funktion von Ypl158c

Die vorliegende Arbeit führte zu dem folgenden Modell einer möglichen Ypl158c-Funktion (Abbildung 6.1). Schon früh im Zellzyklus lokalisiert Ypl158c in Abhängigkeit der Septine am Knospenhals. Der Knospenhals ist einer der Orte in der Zelle, an denen ein intensives Remodellieren der Zellwand stattfindet. Dort könnte Ypl158c schon zu Beginn eines Zellzyklus am Aufbau der Mannoproteinschicht beteiligt sein. Diese Aufgabe müsste es vor allem zum Zeitpunkt der Cytokinese und Zellseparation erfüllen, in der die Mutterzelle sich von der neu entstandenen Tochterzelle trennt. Um die Mannoproteinschicht auf der Mutter- und Tochterzelle aufzubauen, die für eine vollständige Trennung der Zellen notwendig ist, würde vermehrt Ypl158c notwendig, was durch die Swi5 vermittelte Expression erreicht wird. Als eine Folge der Aktivierung von Swi5 in der Anaphase würde verstärkt Ypl158c synthetisiert und könnte somit die Cytokinese vorangetrieben. Nach erfolgter Separation der Zellen verbliebe Ypl158c noch an der Trennungsstelle, um den Aufbau der Mannoproteinschicht zu vollenden. In dieser Funktion stünde Ypl158c in Verbindung zum Zellintegritätsweg, der durch ein Fehlen von Ypl158c verstärkt aktiviert wird.



**Abbildung 6.1 Modell zur Wirkungsweise von Ypl158c**

*YPL158c* ist ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Swi5. Beide wirken am Ende eines Zellzyklus in der Cytokinese und Zellseparation. Zusätzlich ist Ypl158c zusammen mit der MAP Kinase Slt2 an der Erhaltung der Zellintegrität und der  $\beta$ -Glucanmaskierung beteiligt. Die Lokalisation von Ypl158c (türkis) am Knospenhals ist schematisch über den Verlauf eines Zellzyklus hinweg dargestellt, zusammen mit der Position des Kerns (lila).

## 7 METHODEN

### 7.1 Arbeiten mit Bakterien

Zur Amplifikation von *E. coli* - bzw. Hefeshuttlevektoren wurde *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  verwendet (Genotyp: *supE44  $\Delta$ lacU169( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*).

#### 7.1.1 Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) bei 37 °C.

#### 7.1.2 Herstellung elektrokompetenter DH5 $\alpha$ -Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 750 ml TB-Medium mit 40 OD<sub>600</sub> DH5 $\alpha$ -Zellen aus einer Übernachtskultur angeimpft und ca. 20 h bei Raumtemperatur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 in einem 2-Liter Erlenmeyerkolben mit Schikanen unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt, 15 min bei 4 °C und 3000 Upm abzentrifugiert und anschließend in 300 ml eisgekühltem Wasser resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und in 20 ml kaltem 10 % Glycerin aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (4000 Upm, 10 min) wurde das Pellet in 1 ml kaltem 10 % Glycerin gelöst, zu jeweils 50  $\mu$ l aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -70 °C gelagert.

| 103

#### 7.1.3 Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 50  $\mu$ l kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-2  $\mu$ l DNA versetzt und in eine bereits vorgekühlte Elektroporationsküvette (Plattenabstand 2 mm) luftblasenfrei überführt. Der Strompuls wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Feldstärke	12,5 kV/cm
Widerstand	200 $\Omega$
Kapazität	25 $\mu$ F
Kondensatorspannung	2,5 kV

Nach dem Strompuls wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium überführt und für die phänotypische Expression des  $\beta$ -Lactamase-Gens 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde auf LB-Ampicillin-Platten bei 37 °C auf resistente Klone selektiert.

## 7.2 Arbeiten mit Hefe

### 7.2.1 Kultivierung von Hefe

Zur Kultivierung von Hefe wurde XY-Vollmedium verwendet. Als Kohlenstoffquelle diente Glucose (D), Galaktose (G) oder Raffinose (R). Enthielten die Hefezellen ein ARS/CEN- oder ein 2 $\mu$ -Plasmid, wurden sie entsprechend auf Selektivmedium kultiviert. Vorkulturen wurden in Röhrchen auf einem Roller angezogen. Größere Zellmengen, die zur experimentellen Auswertung bestimmt waren, wurden in Glaskolben im Schüttelwasserbad unter definierten Bedingungen kultiviert.

### 7.2.2 Konservierung von Hefestämmen

Um Hefezellen dauerhaft zu konservieren, wurden 2 ml einer Übernachtskultur pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml 15%igem Glycerin resuspendiert und bei -70 °C eingefroren.

104 |

### 7.2.3 Kreuzung haploider Hefestämme

Die Kreuzung haploider Hefestämme ist eine klassische Methode der Hefegenetik, die Genotypen haploider Stämme miteinander zu kombinieren.

Um haploide Hefestämme mit einfachem Chromosomensatz (1N) und entgegengesetzten Paarungstypen zu kreuzen, wurden diese über Nacht auf geeigneten Platten kultiviert. Anschließend wurden kleine Mengen der Stämme auf Vollmediumsplatten miteinander vermengt und abhängig von den Ausgangsstämmen entweder bei 25 °C oder 30 °C mindestens 5 h oder über Nacht inkubiert. Trugen die Ausgangsstämme unterschiedliche Selektionsmarker (Auxotrophiemarker oder Resistenz gegen Antibiotika), konnten diploide Nachkommen mit doppeltem Chromosomensatz (2N) durch Ausstreichen von Zellmaterial auf Einzelkolonien auf einem geeigneten Selektivmedium selektiert werden.

Gab es keine Möglichkeit der Selektion wurden ca. 5 h nach der Kreuzung mit Hilfe des Mikromanipulators Zygoten auf einer Vollmediumsplatte ausgelegt. Um anschließend sicher zu gehen, dass es sich um diploide Zellen handelt, wurde der Paarungstyp mit Hilfe von PCR (7.4.10.3) bzw. die Fähigkeit zur Sporulation (7.2.4) überprüft.

#### 7.2.4 Sporulation diploider Hefezellen und Tetradenanalyse

Bei guten Wachstumsbedingungen durchlaufen diploide Zellen wie haploide Zellen einen mitotischen Zellteilungszyklus. Unter Kohlenstoff- und Stickstoffmangelbedingungen durchlaufen diploide Hefezellen einen meiotischen Zellteilungszyklus. Dabei bilden sie vier von einem Ascus umschlossene haploide Sporen aus, die sogenannte Tetrade. Sporen sind Dauerformen, die wieder in einen mitotischen Zellzyklus eintreten, sobald sich die Wachstumsbedingungen verbessern.

Um unter Laborbedingungen den Sporulationsvorgang möglichst rasch zu induzieren, wurden diploide Zellen in 2 ml nährstoffreichem Prä-Sporulationsmedium angeimpft und bei 25 °C auf einem Roller über Nacht kultiviert. Anschließend wurden sie 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert, in 2 ml Sporulationsmedium gewaschen und nach erneutem Pelletieren in 2 ml Sporulationsmedium aufgenommen. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C auf einem Roller. Die Sporulation dauerte je nach Stammhintergrund etwa 3 (W303) oder 6 (S288C) Tage. Der Anteil sporulierter Zellen wurde im Durchlichtmikroskop überprüft. Für die Tetradenanalyse wurden 100 µl der Sporen-Suspension mit 100 µl Novozym-Lösung gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vereinzelnung und Positionierung der Sporen erfolgte auf einer Vollmediumsplatte mit Hilfe eines Mikromanipulators. Nach 2 bis 4 Tagen waren die einzelnen Sporen zu Kolonien herangewachsen und wurden auf ihren Phänotyp hin untersucht.

| 105

#### 7.2.5 Hefetransformation nach der Lithiumacetat-Methode

Bei dieser Methode von (Gietz *et al.*, 2002) erlangen Hefezellen durch Behandlung mit Lithiumionen die Fähigkeit DNA aufzunehmen.

Dazu wurden etwa  $1,5 \times 10^7$  ( $1,5 \text{ OD}_{600}$ ) Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert und zwei Mal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand quantitativ abgenommen. Anschließend wurden die Komponenten des Transformationsmix einzeln zugegeben. Begonnen wurde dabei mit dem sterilen Wasser, in welchem die Zellen resuspendiert wurden. Anschließend folgten die restlichen Komponenten. Dieser Transformationsansatz wurde dann durch vortexen ( $2 \times 15 \text{ s}$ ) gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde 20 min bei Raumtemperatur gerollert und anschließend weitere 15 min bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (13000 Upm, 12 s), das Pellet in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen und auf geeigneten Selektionsplatten verteilt. Im Falle der Selektionsmarker *nat* und *kan* wurden die Zellen vor

der Selektion mindestens 3 h in Vollmedium ohne Antibiotikum kultiviert, um den Transformanden genügend Zeit zur Ausprägung der Resistenz zu geben.

<b>Transformationsmix:</b>	
PEG 3500 (50 % w/v)	240 µl
Liciumacetat (1 M)	36 µl
Heringssperma DNA	50 µl
DNA + Wasser	34 µl
gesamt	360 µl

### 7.2.6 Test des Wachstumsverhaltens mittels Verdünnungsreihen

Diese Methode dient dazu, das Wachstumsverhalten von Stämmen unter verschiedenen Bedingungen zu charakterisieren.

106 | Eine Übernachtskultur wurde mit Wasser auf eine OD<sub>600</sub> von 1 OD/ml eingestellt. Ausgehend davon wurde eine Verdünnungsreihe in fünf Stufen bei einem Verdünnungsfaktor von 1:10 hergestellt. Diese Verdünnungsreihen wurden in 96 Well Mikrotiterplatten in einem Volumen von 200 µl je Well angesetzt. Mit Hilfe eines Übertragungstempels („Frogger“) wurden anschließend gleiche Volumina auf geeignete Agarplatten transferiert und bei entsprechenden Bedingungen inkubiert.

### 7.2.7 Synchronisation von Hefekulturen

Um zellzykluspezifische Fluktuation von Proteinmengen in einem gegebenen Stammhintergrund nachzuweisen und zu veranschaulichen, ist es hilfreich, Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu arretieren. Diese Arrestzustände können auf unterschiedliche Weise herbeigeführt werden. Manche Methoden erlauben es, die Zellen anschließend wieder synchron in einen Zyklus zu entlassen. Nach der nächsten Teilung sind die Zellen aufgrund der unterschiedlichen Größe von Mutter- und Tochterzelle jedoch nicht mehr synchronisiert.

#### 7.2.7.1 Synchronisation durch Pheromon

Bei der Paarung von Zellen entgegengesetzten Paarungstyps ist es wichtig, dass sich diese in der G1-Phase befinden. Alle Zellen haben dann denselben Status und ihre Zellkerne können fusionieren. Aus diesem Grund sezernieren die Zellen ein Paarungspheromon (a-Faktor oder α-Faktor), das beim entgegengesetzten Paarungstyp einen Arrest in G1-Phase auslöst. Kommt

es zu keiner Paarung, können Wildtypzellen diese Peptide mit Hilfe von Proteasen abbauen und so wieder in den nächsten Zellzyklus eintreten. Diese Reaktion auf das Pheromon kann genutzt werden, um Zellen in der G1-Phase zu arretieren. Im Experiment werden dazu Zellen des Paarungstyps MATa verwendet, bei denen das Gen *BARI*, das für die pheromonabbauende Protease Bar1 codiert, deletiert ist. Durch diese Deletion werden die Zellen sensitiver für  $\alpha$ -Faktor und können alleine nicht mehr aus dem Arrest austreten.

Zu einer exponentiell wachsenden Kultur (0,5 OD<sub>600</sub>/ml) wurden 50 ng/ml  $\alpha$ -Faktor zugegeben (Stammlösung 500  $\mu$ g/ml in H<sub>2</sub>O) und für etwa 3 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Der typische Arrestphänotyp eines sog. Shmoo, wurde im Mikroskop überprüft. In den Fällen, in denen die Zellen in den nächsten Teilungszyklus entlassen werden sollten, wurden sie abzentrifugiert (2 min bei 2000 Upm), in pheromonfreiem Medium gewaschen, in frischem Medium aufgenommen und anschließend bei 30 °C weiter inkubiert.

#### **7.2.7.2 Synchronisation durch Nocodazol**

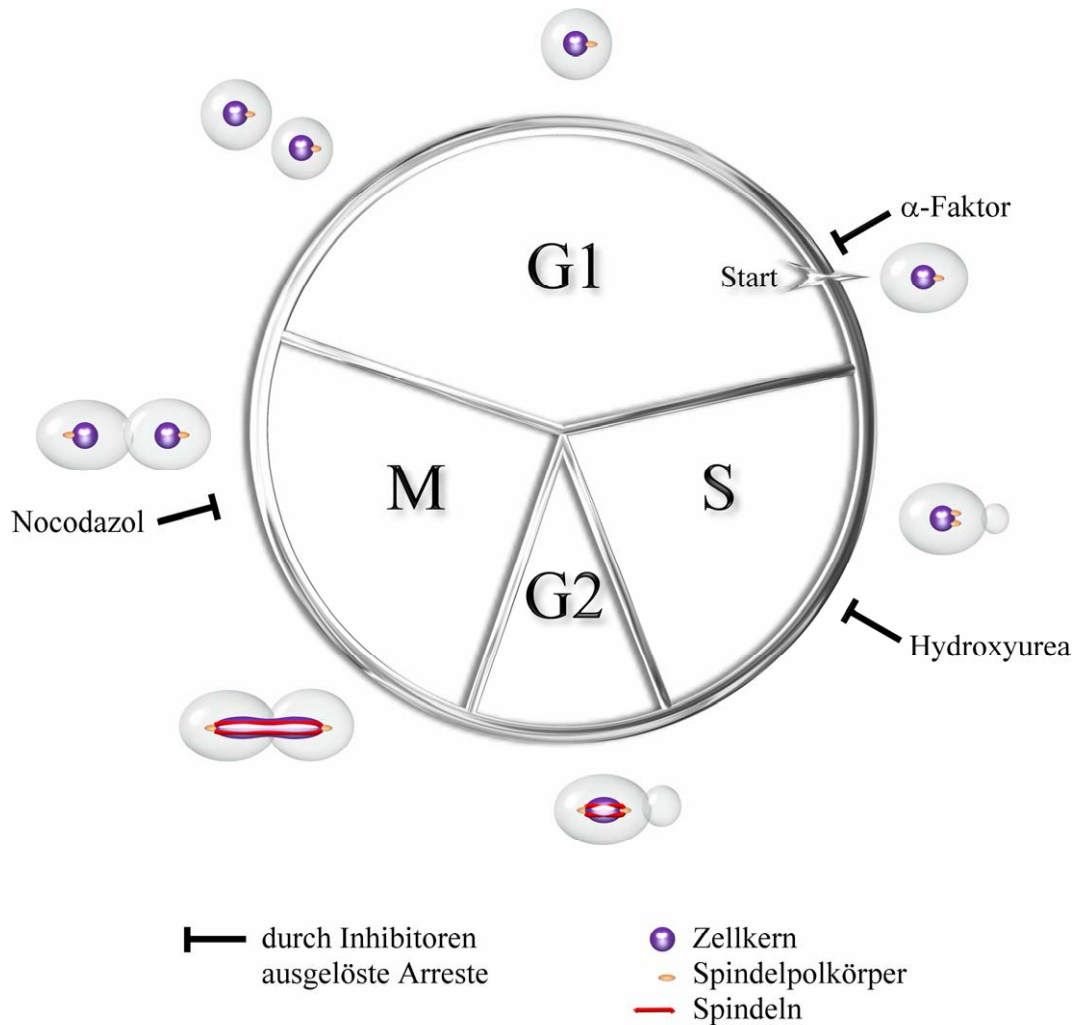
Nocodazol führt zur Depolymerisation der Mikrotubuli und aktiviert dadurch das Spindelkontrollsystem. Die Zellen arretieren vor der Anaphase, in einem Zustand mit replizierter DNA und ungetrennten Chromatiden. Da Nocodazol in Minimalmedium nicht zum gewünschten Arrest führt, kann diese Methode nur bei Kulturen in Vollmedium angewendet werden.

Zu einer exponentiell wachsenden Kultur (0,5 OD<sub>600</sub>/ml) wurden 7,5  $\mu$ g/ml Nocodazol (Stammlösung 1,5 mg/ml in DMSO) zugegeben und für 3 h unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Der Arrestphänotyp wurde im Durchlichtmikroskop überprüft.

#### **7.2.7.3 Synchronisation durch Hydroxyharnstoff**

Hydroxyharnstoff (= Hydroxyurea) ist ein Inhibitor der Ribonukleotid-Reduktase und hemmt die DNA-Replikation. Die Zellen arretieren in der frühen S-Phase mit teilweise replizierter DNA.

Zu einer exponentiell wachsenden Kultur (0,5 OD<sub>600</sub>/ml) wurde Hydroxyharnstoff direkt in einer Endkonzentration von 100 mM zugegeben und für 3 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Der Arrestphänotyp wurde im Durchlichtmikroskop überprüft.



**Abbildung 7.1** Schema der im Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* durch Inhibitoren erreichbaren Arreste

Der Zellzyklus eines Stammes mit Paarungstyp *MATa* kann durch Anwesenheit des Pheromons  $\alpha$ -Faktor noch vor Eintreten in einen neuen Zellteilungszyklus arretiert werden. Durch Anwesenheit von Hydroxyharnstoff (= Hydroxyurea) wird der Zellzyklus in der frühen S-Phase angehalten und bei Anwesenheit von Nocodazol vor der Anaphase der Mitose.

### 7.2.8 Unterbrechung der Proteinneusynthese durch Cycloheximid

Cycloheximid gehört zur Gruppe der Glutarimid-Antibiotika und wird aus dem Organismus *Streptomyces griseus* isoliert. Es hemmt die Proteinneusynthese indem es die Interaktion der Aminoacyl-tRNA mit den Ribosomen hemmt (Obrig *et al.*, 1971). Die Unterbrechung der *de novo* Proteinsynthese ermöglicht Untersuchung der Proteinstabilität.

Zu einer exponentiell wachsenden Kultur (0,5 OD<sub>600</sub>/ml) wurden 0,1 mg/ml Cycloheximid (Stammlösung 20 mg/ml in 100 % Ethanol) zugegeben. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von Cycloheximid wurden Proben genommen und in einer Western-Blot-Analyse auf Degradation ausgewählter Proteine hin untersucht.

## 7.3 Färbung und Mikroskopie von Hefezellen

### 7.3.1 Ethanolfixierung von Hefezellen

Die Ethanolfixierung erzeugt eine poröse Membranstruktur, die eine Färbung der DNA mit interkalierenden Farbstoffen ermöglicht. Hefezellen können mit 70 % Ethanol fixiert werden. Hierzu wurden mindestens 1 OD<sub>600</sub> Zellen abzentrifugiert, in 300 µl Wasser resuspendiert und dann mit 700 µl Ethanol (100 %) gemischt. In diesem Zustand können Zellen 1 – 2 Jahre bei 4 °C aufbewahrt werden. Da die Zellen beim Fixieren agglomerieren, wurden sie vor deren Untersuchung zur Vereinzelung in Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und mit Ultraschall behandelt.

### 7.3.2 Formaldehydfixierung von Hefezellen

Die Fixierung mittels Formaldehyd führt zur Quervernetzung von Proteinen und erhält damit den Proteinstatus der Zellen. Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden Zellen mit 4,5 % Formaldehyd fixiert. Dazu wurden 4,4 ml einer Kultur mit einer Zelldichte von etwa 1 OD<sub>600</sub>/ml mit 610 µl Formaldehyd (37 %) gemischt und für 10 – 30 min bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert und anschließend in 1 ml Puffer B aufgenommen. In diesem Zustand sind die Proben gekühlt nicht länger als eine Woche haltbar und verlieren schnell an Qualität. Sie wurden deshalb in diesem Zeitrahmen weiterverarbeitet.

| 109

### 7.3.3 DNA-Färbung mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylindol) lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an. Bei Anregung mit geeigneter Wellenlänge fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. Daher können durch Färbung mit DAPI, DNA-haltige Organellen, wie Zellkern und Mitochondrien sichtbar gemacht werden.

Ethanolfixierte Zellen wurden zur Vereinzelung mit Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen und mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden 3 µl Zellen auf einem Objektträger mit etwa 2 µl DAPI enthaltendem Mounting-Medium gemischt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### 7.3.4 Färben der Zellwand mit ConA-FITC

Die Zellwand kann durch das Lectin Concanavalin A aus der Schwertbohne *Canavalia ensiformis*, welches an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt ist, gefärbt werden.

Concavalin A bindet dabei spezifisch an kovalent gebundenes  $\alpha$ -Mannan in der Zellwand der Hefe (Tkacz *et al.*, 1971).

Hierzu wurden 0,2 OD<sub>600</sub> ethanolfixierte Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, um sie danach in 200  $\mu$ l PBS aufzunehmen und mit Ultraschall zu behandeln. Für die Färbung wurden die Zellen anschließend 10 min im Dunkeln bei 4 °C mit 60  $\mu$ g/ml ConA-FITC (Stammlösung: 5 mg/ml in H<sub>2</sub>O) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 200  $\mu$ l frischen PBS aufgenommen, nochmals Ultraschall behandelt und am Mikroskop dokumentiert.

### 7.3.5 Aktinfärbung

Aktin kann durch Färbung mit an Farbstoff gekoppeltem Phalloidin sichtbar gemacht werden (Adams *et al.*, 1991). Phalloidin ist das Gift des Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und bindet F-Aktin.

Hierzu wurden formaldehydfixierte Zellen zwei Mal mit 1 ml PBS gewaschen, um sie danach in 1 ml PBS aufzunehmen. 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden mit 10  $\mu$ l an Alexa488 gekoppeltes Phalloidin (Stammlösung: 6,6  $\mu$ M in MeOH) 1 h im Dunkeln auf dem Roller inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fünf Mal mit 1 ml PBS (5000 Upm, 2 min) gewaschen bevor sie am Mikroskop dokumentiert wurden.

110 |

### 7.3.6 Calcofluorfärbung

Calcofluor ist ein Fluorochrom, das eine hohe Affinität für  $\beta$ -1,4-Glucane wie Zellulose und Chitin besitzt (Roncero *et al.*, 1988). Es ist ein geeignetes Verfahren, Zellwand unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

Hierzu wurden formaldehydfixierte Zellen zwei Mal mit 1 ml PBS gewaschen, um sie danach in 1 ml PBS aufzunehmen. 200  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden mit 20  $\mu$ l Calcofluor White (Stammlösung: 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) 30 min im Dunkeln bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mindestens zwei Mal in 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen (5000 Upm, 2 min) und in 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen, bevor sie am Mikroskop dokumentiert wurden.

### 7.3.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die Lokalisation von Proteinen in formaldehydfixierten Zellen wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewandt (Pringle *et al.*, 1991). Dabei werden Proteine von einem spezifischen primären Antikörper erkannt und durch einen IgG-spezifischen sekundären Antikörper, der mit einem Fluorophor gekoppelt ist, in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

### 7.3.7.1 Beschichtung der Multiwell Objektträger mit Polylysin

Auf die verwendeten Multiwell Objektträger wurde pro Vertiefung 10 µl Polylysine (MW > 300000 1 mg/ml) gegeben und für ca. 10 min zum Schutz vor dem Austrocknen in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Wells fünf Mal mit 50 µl Wasser gewaschen und anschließend getrocknet. In diesem Zustand können die Objektträger längere Zeit staubfrei gelagert werden.

### 7.3.7.2 Vorbereitung der Proben für die indirekte Immunfluoreszenz

Formaldehydfixierte Zellen (Fixierzeit 10 – 30 min) wurden in einem Volumen von 0,5 ml mit Puffer B auf eine 1 OD<sub>600</sub>/ml eingestellt. Durch Zugabe von 12,5 mM DTT und 10 µg/ml Zymolyase wurde die Zellwand für ca. 10 – 30 min bei 37 °C verdaut. Zellen, die zuvor in Medium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle gewachsen waren, wurden mindestens 30 min bei 37 °C verdaut. Danach wurden die Zellen 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert und vorsichtig in 250 µl Puffer B resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 40 µl auf einen zuvor mit Polylysin beschichteten Multiwell-Objektträger aufgebracht. Nach etwa 10 min wurde das Volumen wieder abgenommen und die Zellen für 1 h mit jeweils 45 µl PBS/BSA (1 mg/ml) pro Well in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde das PBS/BSA wieder abgenommen und die Objektträger über Nacht mit dem in PBS/BSA verdünnten primären Antikörper (20 µl je Well) wieder in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben erst sieben Mal 5 min mit jeweils 45 µl PBS/BSA gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper (20 µl je Well) in PBS/BSA verdünnt zugesetzt wurde. Nach mindestens zweistündiger Inkubation in der feuchten Kammer, die zum Schutz des gekoppelten Fluorophors dunkel gehalten wurde, wurden die Proben erneut sieben Mal 5 min mit PBS/BSA gewaschen und dann mit etwa 2 µl Mounting-Medium pro Well überschichtet. Der Objektträger wurde mit einem Deckglas abgedeckt und konnte dann im Kühlschrank abgedunkelt für einige Tage aufbewahrt werden.

| 111

### 7.3.8 Mikroskopie

Zur Beobachtung und Dokumentation von Hefezellen wurde ein Axioplan2 Imaging und ein Imager M1 Mikroskop mit einer AxioCam MRm der Firma Zeiss verwendet. Die Steuerung des Mikroskops und der Kamera, sowie die Auswertung und Vermessung der Bilder erfolgte mit Hilfe der AxioVision 4.3 und AxioVs40LE V 4.5.0.0 Software von Zeiss.

### 7.3.9 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der DNA-Gehalt ethanolfixierter Zellen festgestellt (Haase *et al.*, 1997). Dabei wurde die DNA mit dem Fluorochrom Sytox Green angefärbt. Ethanolfixierte Zellen wurden in 1 ml Natriumcitrat-Puffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen, anschließend in 500 µl Natriumcitrat-Puffer aufgenommen und mit Ultraschall behandelt. Danach wurden 0,25 OD<sub>600</sub> Zellen in einem Volumen von 250 µl Natriumcitrat-Puffer mit 20 µl RNase A (10 mg/ml) versetzt und 1 h bei 50 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurden die Zellen erneut 1 h bei 50 °C geschüttelt, dann auf Raumtemperatur abgekühlt und abzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen in 250 µl Natriumcitrat (50 mM, pH 7,0) mit 1 µM Sytox Green resuspendiert und über Nacht bei etwa 4 – 8 °C im Dunkeln gefärbt. Zur Messung im Durchflusszytometer (Partec CA-III) wurden 10 – 20 µl der Probe in 1 – 1,5 ml Tris/HCl (0,5 M, pH 7,5) verdünnt. Die Daten wurden mit der Software WinMDI ausgewertet.

## 7.4 Genetische und molekularbiologische Methoden

### 7.4.1 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

112 |

#### 7.4.1.1 Plasmidpräparation (Minilysate) nach der Kochlysatzmethode

Mit dieser Methode (Berghammer *et al.*, 1993) können high copy-Plasmide aus *Escherichia coli* präpariert werden. Die erhaltene DNA ist zwar noch mit Proteinen verunreinigt, kann aber für Restriktionsanalysen verwendet werden.

2 ml einer Übernachtskultur wurden bei 13200 Upm in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 4 min abzentrifugiert und das Pellet in 40 µl EasyPrep-Puffer resuspendiert. Nach etwa 5 min wurde die Probe für 1 min zu 100 °C gestellt und dann mindestens 1 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zentrifugation (13200 Upm, 15 min) befindet sich die Plasmid-DNA im Überstand, während die Zelltrümmer und genomische DNA ein kompaktes Pellet bilden. Für einen Restriktionsverdau wurden 2 µl des Überstandes verwendet.

#### 7.4.1.2 Plasmidpräparation (Minilysate) durch alkalische Lyse

Mit dieser Methode können low copy-Plasmide aus *Escherichia coli* präpariert werden. Das Prinzip beruht auf alkalischer Lyse mit Ethanol-Fällung.

3 ml einer Übernachtskultur wurden bei 13200 Upm in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 4 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl F1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 150 µl F2-Puffer zugegeben und kurz durch Invertieren gemischt. Gleich

anschließend wurde zur Neutralisierung 150 µl 3 M Kaliumacetat pH 5,0 hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde dann 10 min auf Eis inkubiert bevor er 10 min bei 13200 Upm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl 100%igem Ethanol versetzt. Die Fällung der DNA fand in 10 min bei -70 °C auf Trockeneis statt. Nach 10 min Zentrifugation bei 13200 Upm befand sich die DNA im Pellet. Dieses DNA-Pellet wurde mit 750 µl 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend bis zur vollständigen Entfernung des Ethanols getrocknet. Danach wurde es in 50 µl TE Puffer aufgenommen und resuspendiert. Für einen Restriktionsverdau wurden 3 µl verwendet.

#### 7.4.1.3 Säulenreinigung von Plasmid-DNA

Für die Säulenreinigung von Plasmid-DNA wurde der Minipräparationskit der Firma Qiagen verwendet. Für eine größere Ausbeute reiner DNA erfolgte die Plasmidpräparation mit Hilfe des JETSPIN-Kits von Genomed Die Durchführung entsprach jeweils den Angaben des Herstellers.

#### 7.4.2 Bestimmung von Konzentration und Reinheitsgrad einer DNA-Lösung

Wenn DNA aus Organismen isoliert wird, verbleibt gelegentlich Protein in der Lösung, da dieses oft stark an DNA gebunden ist. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung diente der Quotient aus den optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch durch die Messung der Extinktion (E) bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von  $E_{260} = 1,0$  entspricht hierbei einer DNA Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA oder 20 ng/µl einzelsträngiger DNA. Die optische Dichte bei 280 nm gibt Auskunft über die Konzentration der Proteinkontamination. Je reiner die DNA-Lösung ist, desto größer ist der  $E_{260}/E_{280}$ -Quotient.

| 113

#### 7.4.3 Plasmidpräparation aus Hefezellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA beruht auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand und der Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA. Durch die organischen Lösemittel werden die Proteine ausgefällt. Die Nukleinsäuren verbleiben in der wässrigen Phase. Die Plasmid-DNA aus im  $\beta$ -Galaktosidase-Plattenfarbassay des Hefe-Zwei-Hybrid Screens wurde so isoliert, um sie anschließend zur Amplifikation in *E. coli* zu transformieren und weiter zu analysieren.

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA wurden 5 ml einer Übernachtskultur 2 min bei 2000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen, auf 0,3 g in 1,5 ml Schraubdeckelreaktionsgefäßen vorgelegte Glasperlen (0,45 – 0,5 mm) überführt und kurz zentrifugiert (10 s, 13200 Upm). Der Überstand wurde vollständig abgenommen.

Anschließend wurden 50 µl TE/SDS und 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) zugegeben und die Proben zum Aufschluss der Zellen im Kühllabor in der Retschmühle 5 min bei maximaler Frequenz geschüttelt. Anschließend wurden die Zellfragmente 5 min bei 13200 Upm in der Kühlzentrifuge bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und für die Transformation in *E. coli* mittels Elektroporation verwendet (7.1.3).

### 7.4.4 Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen

Die Isolierung genomischer DNA beruht auf der mechanischen Zerstörung der Zellwand, anschließender Zelllyse durch Detergenzbehandlung und alkoholischer Fällung der DNA (Cryer *et al.*, 1975; Fujimura *et al.*, 1993). Die isolierte DNA kann für PCR-Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente oder die Rettung eines integrierten Plasmides verwendet werden. Dazu wurden 5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert, in 1 ml Wasser gewaschen und in 100 µl Tris/EDTA/SDS (Tris/HCl pH 7,5 50 mM; EDTA 20 mM; SDS 10 mg/ml) resuspendiert. Anschließend wurden ca. 0,3 g Glasperlen zugegeben und der Ansatz 5 min im Kühlraum in einer Retschmühle geschüttelt. Nach Zugabe von 500 µl Tris/SDS/EDTA wurde die Lösung 10 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden 200 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben, die Probe 10 min auf Eis inkubiert und dann der Überstand nach 5 min Zentrifugation bei 13200 Upm in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit 1 ml 100 % Ethanol gefällt. Das Präzipitat wurde kurz abzentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde das Pellet 15 min bei 65 °C getrocknet. Anschließend wurde es in 300 µl TE Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 50 µl RNase A (1 mg/ml) 30 min bei 65 °C inkubiert. Die DNA wurde mit 500 µl 100 % Isopropanol erneut gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend die DNA in 50 µl TE Puffer gelöst.

114 |

### 7.4.5 Gelelektrophorese von DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der man DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennen kann. Sie dient der Reinheitsprüfung, Identifizierung, Trennung und Längenbestimmung von DNA, sowie zur Reinigung von Restriktions- bzw. PCR-Fragmenten.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 0,7 % - 1 % Agarose ultra pure in TAE aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde das Gel in eine Gießvorrichtung (Hofer) gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer (Hofer HE33) überführt und die zu trennende DNA mit 10fach Auftragspuffer gemischt aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer

Stromspannung von 80 V. Als Referenz diente der 1 kb DNA Längenstandard von Invitrogen oder Fermentas.

#### 7.4.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus Agarosegelen zu extrahieren, wurde der Gel-Extraktionskit der Firma Qiagen eingesetzt. Dieses System wurde auch zur Aufreinigung von PCR-Produkten direkt nach der DNA-Amplifikation verwendet. Die Durchführung entsprach den Angaben des Herstellers.

#### 7.4.7 Restriktionsverdau von DNA

Zur Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde folgender Ansatz verwendet:

<b>Standardansatz:</b>	
DNA	0,5-1 µg
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym(e)	2-10 U
H <sub>2</sub> O	Restvolumen
Gesamtvolumen	20 µl

| 115

Die Wahl des Puffers und der Temperatur sowie die Art der Enzyminaktivierung wurden an das verwendete Restriktionsenzym angepasst. Die Dauer des Restriktionsverdaus betrug mindestens 1 h.

#### 7.4.8 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Durch die Behandlung linearisierter doppelsträngiger Vektoren mit alkalischer Phosphatase (Shrimp alkaline phosphatase) wird die 5'-Phosphatgruppe entfernt, wodurch eine Re-Ligation des Vektors verhindert und damit die Kloniereffizienz gesteigert wird. Nach der Behandlung der DNA mit Restriktionsendonuklease(n) wurden zu den 20 µl des Ansatzes 1 µl der alkalischen Phosphatase und 2 µl Phosphatasepuffer (10fach) zugegeben und 20 min bei 37 °C im inkubiert. Dann wurde eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 15 min bei 65 °C durchgeführt und der Vektor anschließend durch Gelelektrophorese und Elution gereinigt.

### 7.4.9 Ligation

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde folgender Ansatz verwendet:

<b>Standardansatz:</b>	
Vektor-DNA	ca. 15-20 ng
Insert-DNA	ca. fünffacher Überschuss
T4-DNA-Ligase	1 U
10x Ligase-Puffer	1 µl
H <sub>2</sub> O	Restvolumen
Gesamtvolumen	10 µl

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

### 7.4.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Polymerasekettenreaktion, engl. *polymerase chain reaction*) können spezifisch DNA-Fragmente amplifiziert werden (Mullis *et al.*, 1986). Der zu amplifizierende Bereich wird durch Verwendung von Oligonukleotidprimern definiert, die zu Bereichen des Zielfragments homolog sind. Durch den Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase (wie beispielsweise *Taq*-Polmerase aus *Thermus aquaticus* oder KOD-Polymerase aus *Thermococcus kodakaraensis*) kann das Fragment in mehreren Zyklen, im Idealfall exponentiell vermehrt werden. Das Produkt kann kloniert, im Agarosegel analysiert oder zur Genommanipulation direkt in Hefe transformiert werden.

Im analytischen Maßstab wurde auf diese Weise die Integration von Plasmiden ins Hefegenom oder auch die Genommanipulation durch transformierte PCR-Produkte (Epitopmarkierung, Deletion) sowie der Paarungstyp überprüft. Dabei diente entweder isolierte genomische DNA (7.4.4) oder auch direkt Hefekolonien (7.4.10.3) als Template. Im präparativen Maßstab wurde die PCR-Methode angewendet, um Hefegene aus genomischer DNA zu vervielfältigen und sie anschließend zu klonieren.

Die PCR-Reaktionen wurden typischerweise in einem Ansatz von 50 µl durchgeführt, der sich wie folgt zusammensetzte:

<b>Standard PCR-Ansatz:</b>	
<i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer (10x)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Primer fwd (10 pmol/µl)	3 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	3 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
Template DNA	x µl
H <sub>2</sub> O	Restvolumen
Gesamtvolumen	50 µl

<b>Temperaturprofil:</b>			
Denaturierung	94 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	45 s	10 - 30 Zyklen
Annealing	56 °C	45 s	
Amplifikation	72 °C	1 min/ kb	
Restamplifikation	72 °C	5 min	

| 117

Zeiten und Temperaturen wurden den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Für eine präparative PCR wurde an Stelle der *Taq*-DNA-Polymerase die KOD-Polymerase eingesetzt.

### 7.4.10.1 PCR zur Amplifikation von DNA Fragmenten

Diese Methode wurde präparativ eingesetzt, um Gene aus dem Genom oder von einem Plasmid für Klonierungen zu amplifizieren. Dazu wurden Oligonukleotidprimer eingesetzt, denen an ihren Enden zusätzlich Restriktionsschnittstellen angefügt wurden, um sie spezifisch in einen vorgesehenen Vektor klonieren zu können.

#### Reaktionsansatz DNA-Fragmente:

KOD-DNA-Polymerasepuffer (10x)	5 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Primer fwd (10 pmol/µl)	3 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	3 µl
KOD-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1,5 µl
Template DNA	1 µl
H <sub>2</sub> O	25,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

118 |

#### Temperaturprofil:

Denaturierung	94 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	45 s	15 Zyklen
Annealing	58 °C	30 s	
Amplifikation	72 °C	2 min 20 s	
Restamplifikation	72 °C	10 min	

Die Annealingtemperatur sowie die Amplifikationszeit wurden an die Primer, das Template und an die Länge des zu amplifizierenden Fragments angepasst. Die Menge der eingesetzten Template-DNA hängt von deren Konzentration ab.

### 7.4.10.2 PCR zur Genommanipulation

Um Proteine mit einem HA3- oder MYC13-Epitop zu markieren oder auch um ein Gen gezielt zu deletieren, wurde das pFA6a-System von Longtine *et al.* verwendet (Longtine *et al.*, 1998). Hierbei werden die Primer so konstruiert, dass sie jeweils 45 – 50 bp homolog zu der Zielsequenz der geplanten homologen Rekombination im Hefegenom und 20 bp homolog zu der zu amplifizierenden Sequenz des pFA6a-Plasmids sind. Von dem erhaltenen PCR-Produkt wurden 10 – 15 µl direkt in Hefe transformiert. Eine erfolgreiche Manipulation wurde ebenfalls mittels PCR verifiziert. Die PCR zur Amplifikation der Konstrukte sah folgendermaßen aus:

#### Reaktionsansatz Genommanipulation:

KOD-DNA-Polymerasepuffer (10x)	5 µl
MgSO <sub>4</sub> (25 mM)	6 µl
dNTP-Mix (2 mM)	5 µl
Primer fwd (10 pmol/µl)	3 µl
Primer rev (10 pmol/µl)	3 µl
KOD-DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
Plasmid- DNA (pFA6a) ca. 50 ng	1 µl
H <sub>2</sub> O	26 µl
Gesamtvolumen	50 µl

#### Temperaturprofil:

Denaturierung	94 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	45 s	25 Zyklen
Annealing	56 °C	45 s	
Amplifikation	72 °C	2 min 20 s	
Restamplifikation	72 °C	5 min	

### 7.4.10.3 Paarungstyp-Bestimmung mittels Kolonie-PCR

Für die Paarungstyp-Bestimmung per PCR (Huxley *et al.*, 1990) wurde eine DNA-Extraktion mit SDS vorgenommen (Akada *et al.*, 2000). Dazu wurde mit einer sterilen Plastik-Pipettenspitze Zellmaterial aufgenommen und in 20 µl einer 0,25 % SDS-Lösung resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min, 13200 Upm) wurde der Überstand als Matrize für die PCR eingesetzt:

#### Reaktionsansatz Paarungstyp:

<i>Taq</i> -DNA-Polymerasepuffer (10x)	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (2 mM)	2,5 µl
Primer Mix (10 pmol/µl) (WS826, WS827 und WS828)	3 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,15 µl
Überstand aus der DNA-Extraktion	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	14,85 µl
Gesamtvolumen	25 µl

120 |

#### Temperaturprofil:

Denaturierung	94 °C	4 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	35 Zyklen
Annealing	55 °C	1 min	
Amplifikation	72 °C	40 s	
Restamplifikation	72 °C	3 min	

Nach Ablauf der Reaktion wurde das Amplifikat in einem Agarosegel analysiert. Im Fall von *MATa*-Zellen ergibt sich ein DNA-Produkt von 544 bp und im Fall von *MATα*-Zellen ein Produkt von 404 bp. Ist die Zelle diploid werden beide Fragmente amplifiziert.

## 7.5 Proteinanalytische Methoden

### 7.5.1 Herstellung von Proteinlysaten aus Hefezellen

Die Proteinextrakte wurden durch mechanischen Aufschluss von Hefezellen mit Glasperlen hergestellt. Dazu wurden mindestens  $5 \times 10^7$  Hefezellen aus der exponentiellen Wachstumsphase in Zentrifugen-Röhrchen abzentrifugiert (Megafuge, 2000 Upm, 2 min). Die Zellen wurden in 130 – 150  $\mu$ l Puffer3 (versetzt mit 60 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat) resuspendiert, in ein Schraubdeckelgefäß mit 0,3 g Glasperlen (0,45 – 0,5 mm) überführt und auf Trockeneis schockgefroren. Für den Zellaufschluss wurde die Probe aufgetaut und im Kühllabor in der Retschmühle 5 min bei maximaler Frequenz geschüttelt. Anschließend wurden die Zellfragmente 1 min bei 13200 Upm in der Kühlzentrifuge bei 4 °C pelletiert. 70  $\mu$ l des Überstandes wurden mit dem gleichen Volumen Lämmli-Auftragspuffer (2x) gemischt und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Im Falle eines Nachweises von Ypl158c entfiel das pelletieren der Zellfragmente in der Kühlzentrifuge. Es wurde entsprechend dem Puffer3-Volumen Lämmli-Auftragspuffer (2x) direkt auf das Proteinlysate gegeben, gemischt und für 10 min bei 100°C inkubiert. Erst dann wurden die Zellfragmente durch 1 min Zentrifugation bei 13200 Upm pelletiert.

Für die Proteinbestimmung wurde ein Aliquot des Überstandes 1:1000 verdünnt und 1:2 mit Bradfordreagenz gemischt. Die Probe wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die OD bei 595 nm bestimmt. Auf eine Erstellung einer Kalibriergeraden für das Bradfordreagenz wurde verzichtet, da nur die relativen Proteinkonzentrationen für eine gleichmäßige Ladung des Gels wichtig waren.

| 121

### 7.5.2 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation

Diese Methode dient der Fraktionierung einzelner Zellbestandteile aus einem Zellhomogenat. Basis dafür sind Zentrifugationsverfahren, die die Trennung von Teilchen nach Größe, Gestalt und Dichte ermöglichen, da sie im Zentrifugalfeld unterschiedlich schnell sedimentieren. Bei der differentiellen Zentrifugation wird das Zellhomogenat stufenweise höheren Zentrifugalbeschleunigungen bei schrittweise verlängerten Zentrifugationszeiten ausgesetzt. Dabei verwendet man jeweils nur den Überstand für die weiteren Zentrifugationsschritte. Man erhält dadurch eine Reihe von Fraktionen mit Zellbestandteilen abnehmender Dichte. Diese können dann weiteren Analysen unterzogen werden.

Dazu wurden 200 ml Kultur mit einer Zelldichte von  $< 1,0 \text{ OD}_{600}$  in zwei Portionen geerntet. Jedes Pellets wurden anschließend in jeweils 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, in 200  $\mu$ l Puffer 3-D

aufgenommen und in ein Schraubdeckelgefäß mit 0,3 g Glasperlen (0,45 – 0,5 mm) überführt. Für den Zellaufschluss wurden die Proben auf Eis aufgetaut und im Kühllabor in der Retschmühle 7 min bei maximaler Frequenz geschüttelt. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte 5 min bei 2500 Upm bei 4 °C in der Kühlzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco). Dabei wurde das erzeugte Zelllysate von nicht lysierten Zellen und Kernen befreit. Anschließend wurden die Überstände vereinigt und das Volumen mit Puffer 3-D auf 500 µl aufgefüllt. 50 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Lämmli-Auftragspuffer (2x) gemischt und 10 min bei 100 °C inkubiert (Gesamtlysateprobe G). An dieser Stelle wurde eine Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt, um einen Anhaltspunkt für die Gesamtproteinkonzentration zu erhalten. Der Überstand wurde einem zweiten Zentrifugationsschritt unterzogen. Er erfolgte 10 min bei 13000 Upm bei 4 °C in der Kühlzentrifuge (Heraeus Biofuge fresco). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 µl Puffer 3-D resuspendiert. Sowohl vom Überstand als auch vom resuspendierten Pellet wurden 50 µl mit 50 µl Lämmli-Auftragspuffer (2x) gemischt und 10 min bei 100 °C gekocht (Überstand-Probe S<sub>13</sub> und Pellet-Probe P<sub>13</sub>). Die Pellet-Fraktion sollte nach dieser niedertourigen Zentrifugation größere Membranfragmente und Organellen enthalten. Der restliche Überstand wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und einer letzten Zentrifugation für 1 h bei 100000 Upm und 4 °C (Beckmann Ultrazentrifuge Optima™ TL, Rotor: TLA 100.3) unterzogen. Der Überstand wurde anschließend sofort abgenommen und das Pellet in 500 µl Puffer 3-D resuspendiert. Auch hier wurden wieder 50 µl vom Überstand und dem resuspendierten Pellet mit 50 µl Lämmli-Auftragspuffer (2x) gemischt und 10 min bei 100 °C gekocht (Überstand-Probe S<sub>100</sub> und Pellet-Probe P<sub>100</sub>). Dieser Überstand sollte alle löslichen Zellbestandteile enthalten, das Pellet Plasmamembran, Ribosomen und microsomale Fragmente.

### 7.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können in SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch proportional zu ihrer Masse aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Sie werden vor der Auftrennung im Gel durch Inkubation mit dem Detergens SDS denaturiert. Dabei werden nicht-kovalente Proteinaggregate aufgelöst. Da SDS sehr effizient an Proteine bindet und negativ geladen ist, wird die Eigenladung des Proteins i.d.R. vernachlässigbar. Das Verhältnis von Ladung zu Größe ist für jedes Protein annähernd gleich und die Proteine bewegen sich im Gel proportional zu ihrer Größe. Das Reduktionsmittel β-Mercaptoethanol wird dabei eingesetzt, um vorhandene Disulfidbrücken aufzulösen. Die aufgetragenen Proteinmengen wurden einander anhand der gemessenen OD<sub>595</sub> angepasst. Die Gelelektrophorese wurde mit 25 mA

pro Gel durchgeführt. Danach wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für die Western-Blot-Analyse verwendet.

#### 7.5.4 Western-Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

Bei der Western-Blot-Analyse wurden die in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit spezifischen primären und HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern nachgewiesen.

Zum Transfer wurde auf eine Graphitelektrode ein mit Transferpuffer getränktes Whatman GB004, darauf eine in Wasser äquilibrierte Nitrocellulosemembran, das Gel und abschließend wieder ein mit Transferpuffer getränktes Whatman GB004 luftblasenfrei übereinander geschichtet. Die zweite Elektrode deckte diesen Aufbau ab. Der Transfer erfolgte entweder 70 min bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel oder 45 min bei 160 mA pro Gel. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran mit Ponceau S gefärbt, um eine gleichmäßige Beladung und den gleichmäßigen Transfer überprüfen zu können. Zur Dokumentation wurde überschüssiger Farbstoff mit Wasser abgewaschen und die gefärbte Membran eingescannt. Danach wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in TBS-T-Milch (5 % Magermilchpulver in TBS-T gelöst) geblockt, um unspezifische Bindestellen der Membran zu sättigen. Die Inkubation mit dem in 5 ml TBS-T-Milch verdünnten primären Antikörper erfolgte bei etwa 8 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal 5 min mit je 10 ml TBS-T gewaschen und dann in 5 ml TBS-T-Milch mit dem sekundären Antikörper versetzt. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut drei Mal 5 min mit je 10 ml TBS-T gewaschen und in TBS aufgenommen. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mit dem Chemiluminescence Blotting Substrat (Roche, 9 µl Reagenz A mit 900 µl Reagenz B gemischt) und durch Auflegen eines Röntgenfilms, der an Stellen der Antikörperbindung geschwärzt wird.

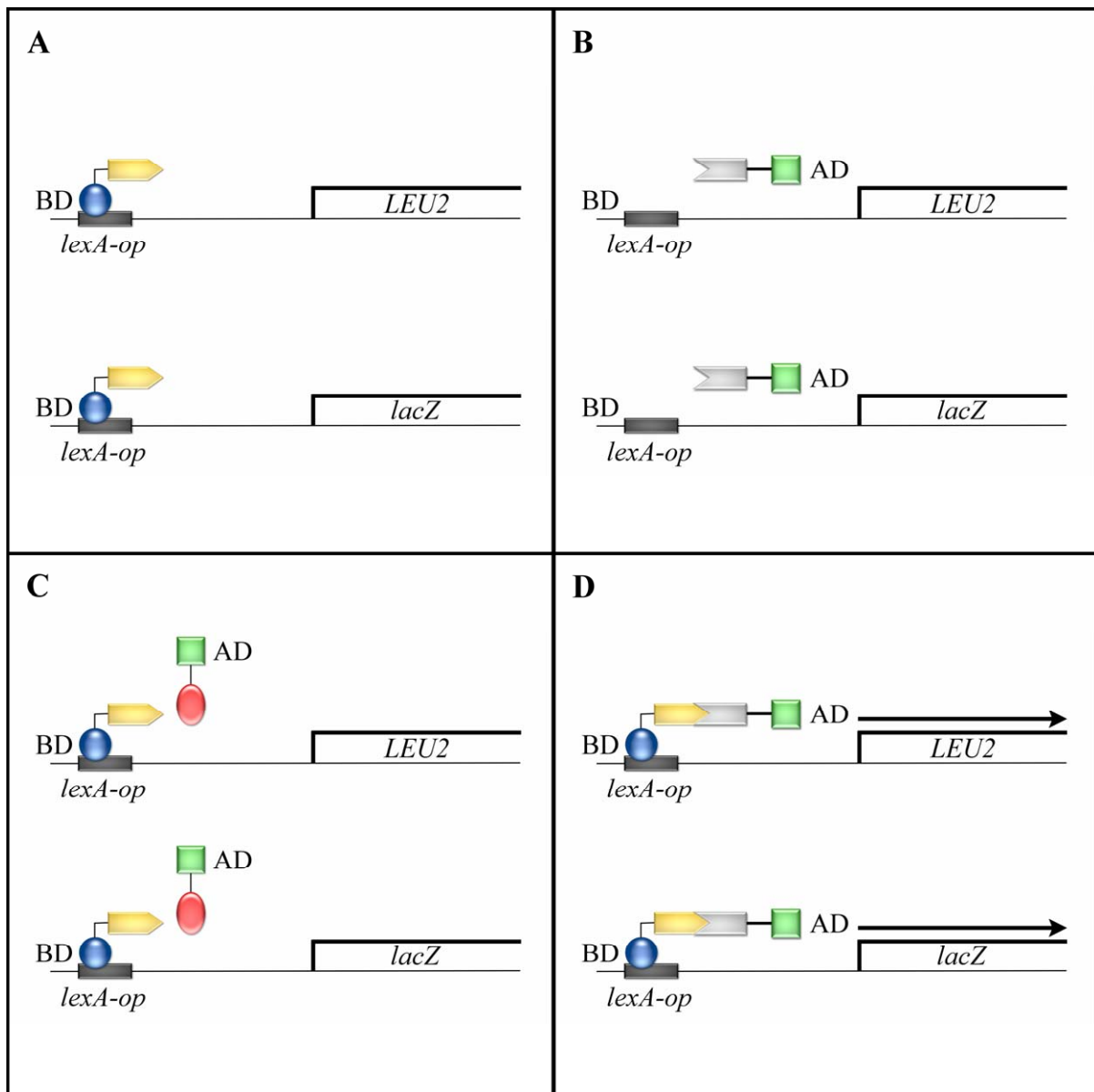
| 123

#### 7.6 Zwei-Hybrid-Screen

Das Zwei-Hybrid-System ist eine Hefe-basierte genetische Technik, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen (Fields *et al.*, 1994). Dieses System beruht auf folgender Überlegung (siehe auch Abbildung 7.2): Transkriptionsfaktoren bestehen meist aus mindestens zwei Domänen, einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivierungsdomäne. Diese werden im Zwei-Hybrid-System voneinander getrennt und als Fusionsproteine exprimiert. Einzeln kann keine der beiden Domänen als vollständiger Transkriptionsaktivator wirken. Die Expression eines Reportergens dient hierbei als Maß für die Fähigkeit der Fusionsproteine durch Interaktion einen aktiven

Transkriptionsfaktor aus DNA-Bindedomäne und Transkriptionsaktivierungsdomäne *in vivo* zu rekonstituieren. In diesem Zwei-Hybrid-Screen sollten unbekannte Interaktionspartner des Proteins Ypl158c identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde zum einen das bakterielle *lacZ*-Gen, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase kodiert und zum anderen das *LEU2*-Gen, das für ein essentielles Genprodukt im Leucin-Biosyntheseweg kodiert, verwendet. Das *lacZ*-Gen wird als Reportergen für einen Plattenfarbassay verwendet. Die  $\beta$ -Galaktosidase spaltet hierbei die chromogene Substanz (5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal), wodurch das tiefblaue 5-Brom-4-chlor-indigo entsteht. Das *lacZ*-Gen ist in dem Stamm W276 (*MAT $\alpha$  his3, trp1, ura3-52::lexA-op-lacZ-URA3, leu2::lexA-op-LEU2*) an einem Markerlokus integriert und wird unter Kontrolle der *lexA*-Operatorsequenzen expremiert. Für die Herstellung eines Fusionsproteins aus Ypl158c und einer N-terminalen *lexA*-DNA-Bindedomäne wurde das Plasmid pJK202 (2 $\mu$ , *HIS3 pADH-lexA-tADH, NLS*) verwendet. Die Klonierung der *YPL158c*-DNA-Sequenz erfolgte über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pJK202 (resultierend pWS1984). Als Vektor für Fusionsproteine aus potentiell interagierenden Proteinen und einer N-terminalen Transkriptionsaktivierungsdomäne diente pJG4-5 (2 $\mu$ , *TRP1 pGAL1-NLS-Transkriptionsaktivierungsdomäne-HA-tADH*). Als Reporterstamm diente der mit pWS1984 transformierte W276 (W6188).



| 125

**Abbildung 7.2 Modell der Transkriptionsaktivierung im Zwei-Hybrid-System**

**A.** Expression des Fusionskonstrukts mit der DNA-Bindedomäne, keine Transkriptionsaktivierung. **B.** Expression des Fusionskonstrukts mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne, keine Transkriptionsaktivierung.

**C.** Expression beider Fusionskonstrukte, aber keine Interaktion, keine Transkriptionsaktivierung. **D.** Expression beider Fusionskonstrukte und Interaktion der Proteine, Transkriptionsaktivierung.

AD = Aktivierungsdomäne, BD = DNA-Bindedomäne, *lexA-op* = *lexA*-Operator

Im Screen wurde der Reporterstamm W6188 in 180 einzelnen Ansätzen mit der pJG4-5-Genbank transformiert. Für eine erste Selektion der circa 140 000 daraus resultierenden Transformanden auf Leucin-abhängiges Wachstum und somit auf eine Expression des *LEU2*-Gens wurden die Transformanden von der Selektionsplatte geschwemmt. Dazu wurde auf jede Transformandenplatte 1,5 ml steriles 15 % Glycerin gegeben und die Hefekolonien durch vorsichtiges Abkratzen mit einer Glaspipette in einer Suspension vereinigt. Davon wurden anschließend 100 µl in 5 ml Histidin- und Tryptophan-freies Selektivmedium mit 2 % Galaktose und 2 % Raffinose ( $S_{\text{Raf}(1\%)/\text{Gal}(1\%)}\text{-His-Trp}$ ) resuspendiert und 4 h bei 30 °C inkubiert, um eine Expression der unter dem *GALI*-Promotor stehenden Fusionsproteine mit der Transkriptionsaktivierungsdomäne zu gewährleisten. Dann wurden jeweils 1 OD<sub>600</sub> Zellen auf  $S_{\text{Raf}(1\%)/\text{Gal}(1\%)}\text{-His-Trp-Leu}$ -Platten ausplattiert und für 4 Tage bei 30 °C inkubiert. Für eine zweite Selektion im β-Galaktosidase-Plattenfarbassay mit X-Gal wurden jeweils 10 der nach der ersten Selektion gewachsenen Kolonien erneut auf  $S_{\text{Raf}(1\%)/\text{Gal}(1\%)}\text{-His-Trp}$ -Platten übertragen. Nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen mit 10 ml eines flüssigen Agar-Gemisches (siehe unten), welches das Substrat X-Gal enthielt, überschichtet. Die qualitative Auswertung der Blaufärbung erfolgte fotografisch nach einem Tag Inkubation bei 30 °C.

126 |

<b>Überschichtungsagar (1 Platte)</b>	
1 % Agar	5 ml
1 M Natriumphosphat-Puffer pH7,0	5 ml
DMFA	600 µl
10 % SDS	100 µl
X-Gal (20 mg/ml in DMFA)	100 µl
Gesamtvolumen	10,8 ml

Aus im β-Galaktosidase-Plattenfarbassay positiven Hefeklonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (7.4.3), zur Amplifikation durch Elektroporation in *E. coli* transformiert (7.1.3) und anschließend zur Analyse im Restriktionsverdau wieder isoliert (7.4.1.1). Aus daraus resultierenden möglichen positiven Klonen wurde die reine Plasmid-DNA in größerem Maßstab für eine Sequenzierung isoliert (7.4.1.3).

## 8 MATERIAL

### 8.1 Nukleinsäuren

1 kb Plus DNA-Längenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe Fermentas Internatoinal Inc., Burlington (Canada)
dNTPs	New England Biolabs, Ipswich (USA) Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Lachssperma-DNA	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Oligonukleotide	MWG-Biotech AG, Ebersberg metabion international AG, Martinsried

### 8.2 Proteine und Enzyme

$\alpha$ -Faktor	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Fermentas Internatoinal Inc., Burlington (Canada)
BSA	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen (Merck), Darmstadt
Lysozym	Fluka, Deisenhofen
Novozym 234	NovoBiolabs, Bagsværd (Dänemark)
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt
Proteinstandard	New England Biolabs, Ipswich (USA) und Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Restriktionsendonukleasen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim New England Biolabs, Ipswich (USA)
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim AppliChem GmbH, Darmstadt
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Taq</i> -Polymerase	Biomaster GmbH, Windeck
Zymolyase 20T	Seikagaku Corporation, Tokio (Japan)

## 8.3 Antikörper und Seren

### 8.3.1 Primäre Antikörper und Seren

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Einsatz</u>	<u>Beschreibung</u>
12CA5	1:100 1:60	WB IF	Monoklonaler Mausantikörper gegen das HA-Epitop (Field <i>et al.</i> , 1988)
9E10	1:100 1:20	WB IF	Monoklonaler Mausantikörper gegen das c-MYC-Epitop (Evan <i>et al.</i> , 1985)
A14	1:80	IF	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen das c-MYC-Epitop (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz USA)
Anti-Cdc11 (y-415)	1:150	IF	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen die Aminosäuren 1-415 von Cdc11 aus <i>S. cerevisiae</i> (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz USA)
Anti-Clb2	1:5000	WB	Polyklonales Kaninchenserum gegen Clb2 (Amon <i>et al.</i> , 1994)
Anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase	1:200	WB	Polyklonaler Kaninchenantikörper gegen die phosphorylierte Form der humanen MAP Kinasen p44 und p42 (Thr202 und Tyr204) (Cell Signaling Technology Inc., Danvers USA)
Anti-Tub2	1:5000	WB	Polyklonales Kaninchenserum gegen $\beta$ -Tubulin (Eurogentec Deutschland GmbH, Köln)
Yol1/34p	1:100	IF	Monoklonaler Ratteantikörper gegen Tubulin (Sera-Lab Ltd., Sussex, UK)

### 8.3.2 Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Einsatz</u>	<u>Herkunft</u>
Anti-Kaninchen-Alexa546	1:250	IF	MoBiTec GmbH, Göttingen
Anti-Maus-Alexa488	1:250	IF	MoBiTec GmbH, Göttingen
Anti-Ratte-Alexa546	1:250	IF	MoBiTec GmbH, Göttingen
Schaf-Anti-Maus-IgG- HRP	1:2500	WB	Dianova, Hamburg
Ziege-Anti-Kaninchen- IgG-HRP	1:2500	WB	Dianova, Hamburg

### 8.4 Chemikalien

1-Butanol p.a.	Merck KGaA, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Fluka, Deisenhofen
Aceton p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid 30 %/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Adeninsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose ultra pure	Gibco BRL, Paisley (Schottland)
	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aminosäuren	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Fluka, Deisenhofen
	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Biomol, Hamburg
	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bacto Agar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Pepton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bacto Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Bradfordreagenz	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calcofluor White (Fluorescent Brightener28)	Sigma Chemical Company, St.Louis

Canavanin	Sigma Chemical Company, St.Louis
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
clonNAT (Nourseothricin)	Werner BioAgents, Jena
ConA-FITC	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Cycloheximid	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
DAPI	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
D-Galaktose	Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg
D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylformamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe AppliChem GmbH, Darmstadt
D-Raffinose	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
D-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
D-Sorbitol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
EDTA	Fluka, Deisenhofen Gerbu Trading GmbH
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Euroagar	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)
Formaldehyd (37 %)	Fluka, Deisenhofen
G418-Sulfat	Calbiochem (Merck KGaA), Darmstadt
Galaktose	Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg
Glucose-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin p.A.	Biomol GmbH, Hamburg Merck KGaA, Darmstadt
Hydroxyharnstoff	AppliChem GmbH, Darmstadt
Igpal CA-630	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt

---

Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka, Deisenhofen Merck KGaA, Darmstadt
Lithiumacetat	Fluka, Deisenhofen
Magermilchpulver	Humana Milchunion eG Lasana, Everswinkel
Methanol p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
myo-Inositol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natriumfluorid	Fluka, Deisenhofen
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Nocodazol	Fluka, Deisenhofen
p-Aminobenzoessäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phalloidin Alexa488	Molecular Probes (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
Phenol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Polyethylenglykol PEG 3350	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Poly-L-lysine hydrobromide MW>300000	Sigma Chemical Company, St. Louis (USA)
Ponceau S	Fluka, Deisenhofen
ProteinA-Agarose	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz (USA)
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Sytox Green	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TEMED	Fluka, Deisenhofen

Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe USB Corporation, Staufen
Tween 20	Fluka, Deisenhofen Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Uracil	AppliChem GmbH, Darmstadt
X-Gal	AppliChem GmbH, Darmstadt
Yeast Nitrogen Base	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes (USA)

### 8.5 Sonstige Materialien

Blotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH - Applied Science, Mannheim
BM Chemiluminescence	Roche Diagnostics GmbH - Applied Science, Mannheim
CEA RP Röntgenfilme	CEA Deutschland GmbH, Hamburg
Deckgläser 22 x 22 mm	Marienfeld GmbH & Co. KGm Lauda- Königshofen
132   Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Dialysemembran VS 0,025 µm	Millipore GmbH, Schwalbach
DV-B BLUE Röntgenfilme	Typon Röntgenfilm GmbH, Grünstadt
Elektroporationsküvetten	Equibio, Maidstone Kent (UK) Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glasperlen (0,45-0,5 mm)	Braun Biotech, Melsungen
Impfösen steril 1 µl	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
JETSPIN Kit	Genomed GmbH, Löhne
Küvetten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht
Miniprep Kit	QIAGEN GmbH - Germany, Hilden
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Objektträger 12 Well	MP Biomedicals, LLC, Solon (USA)
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig

S/W Filmentwickler und Fixierer	Tetenal AG & CO. KG, Norderstedt
	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
	Nalge Nunc International Corp., Rochester (USA)
Whatman GB004 und GB005	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel

## 8.6 Geräte

Brutschrank Tv50b	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Brutschrank WB 120 K	Mytron Bio- und Solartechnik GmbH, Heilbad Heiligenstadt
Dark Reader	Clare Chemical Research, Dolores (USA)
Digitalkamera Camedia E10	Olympus, Hamburg
Digitalkamera Cyber-Shot 3.3	Sony, Berlin
Digitalkamera E-500	Olympus, Hamburg
Durchflusszytometer CA-III	Partec, Münster
Elektroblotapparatur Semi-Dry SEDEC M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektroporationsapparatur Easyject Prima	Equibio, Kent (UK)
Gelapparatur für Acrylamidgele, Minigel Twin G42	Biometra, Göttingen
Gelapparatur für Agarosegele, Modell HE33	Hoefler, San Francisco (USA)
Heizblock	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen Labnet International Inc., Berkshire (UK)
Magnetrührer MR2000 und MR2002	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
Mehrkanalpipetten Research® (variabel) 100 µl, 300 µl, 8-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanal-Pipette Research® pro (elektronisch) 1200 µl, 8-Kanal	Eppendorf AG, Hamburg
Mikromanipulator	MSM System Singer Instruments
Mikroskop Axioplan2	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Axiostar	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

Mikroskop Imager M1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Mikroskop Standard 25	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter 766 Caltimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Pipetten Labmate™ L10, L20, L200, L1000	Abimed GmbH, Langenfeld
Pipetten Research® (variabel) 2,5µl, 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl, 5000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzglasroller TC-7	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Retschmühle MM200 und MM2000	Kurt Retsch GmbH, Haan
Rotator	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Rotator mit Vortexer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Schüttelwasserbad	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Schüttelwasserbad Aquatron	Infors AG, Einsbach
Schüttelinkubator VorTemp56	Labnet International Inc., Berkshire (UK)
Sonicator W385	Weber Ultrasonics GmbH, Karlsbad-Ittersbach
Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Spannungsgerät E122, E844 und EV243	Consort, Turnhout (Belgien)
Spektrophotometer Novaspec II	LKB Pharmacia, Freiburg
Spektrophotometer Ultrospec III	LKB Pharmacia, Freiburg
Thermocycler	Techne Genius Thermo DUX, Wertheim
Thermocycler Primus 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
UV Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla (USA)
UV-Tisch TF-20 M	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée (Frankreich)

Vortex Mixer	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg
Waage Kern EW6200-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage Mettler AE50	Mettler Toledo Intl. Inc., Greifensee (Schweiz)
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Wippe	Bachhofer, Reutlingen
Wippe Rocky	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Wippschüttler ST 5 CAT	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Zentrifugen:	
Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Multifuge 3L	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge RC-5b	Sorvall, Bad Homburg
Tischzentrifuge Biofuge pico und fresco	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge Optima™ TL	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5810 F	Eppendorf AG, Hamburg

## 8.7 Medien, Puffer und Lösungen

### 8.7.1 Bakterienmedien

LB-Flüssigmedium	Bacto Trypton	10 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 g/l
TB-Flüssigmedium	Bacto Trypton	12 g/l
	Bacto Yeast Extract	24 g/l
	Glycerin	4 ml
	Wasser	ad 900 ml
	→ autoklaviert 0,17 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,72 M $\text{K}_2\text{H PO}_4$	100 ml
SOC-Flüssigmedium	Bacto Trypton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	5 g/l
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	$\text{MgCl}_2$	10 mM
	Glucose	20 mM

136 |

Für die Herstellung von festen Medien wurden 1,7 % (w/v) Euroagar zugegeben. Ampicillinresistente Klone wurden durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin zum Medium selektiert.

### 8.7.2 Hefemedien

Vollmedium flüssig (XY)	Bacto Pepton	20 g/l
	Bacto Yeast Extract	10 g/l
	Tryptophan	0,2 g/l
	Adeninsulfat	0,1 g/l
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	10 mM
	→ autoklaviert	
	Zucker	20 g/l
Selektivmedium flüssig (S)	Yeast Nitrogen Base (10x)	100 ml/l
	Dropout-5 (10x)	100 ml/l
	Zucker	20 g/l

Je nach Auxotrophiemarker der verwendeten Stämme wurde Adenin (50 mg/l), Histidin (50 mg/l), Leucin (100 mg/l), Tryptophan (100 mg/l) oder Uracil (50 mg/l) zugesetzt. Für die Herstellung von festen Medien wurden 1,7 % (w/v) Bacto Agar zugegeben.

Toxine zur Selektion resistenter Hefeklone wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

G418	500 µg/ml für den Stammhintergrund W303 200 µg/ml für den Stammhintergrund S288C	
clonNAT	100 µg/ml	
Canavanin	50 µg/ml	
Prä-Sporulationsmedium	Bacto Yeast Extract Bacto Pepton Adeninsulfat Glucose → sterilfiltriert	8 g/l 3 g/l 50 mg/l 100 g/l
Sporulationsmedium	Bacto Yeast Extract Kaliumacetat Dropout++ (10x) Glucose → sterilfiltriert	1 g/l 10 g/l 10 ml/l 0,5 g/l

### 8.7.3 Puffer und Lösungen

| 137

Cycloheximid-Stammlösung	Cycloheximid in EtOH	20mg/ml
DNA-Auftragspuffer	Tris/HCl, pH 7,8 EDTA Bromphenolblau Glycerin	10 mM 1 mM 2,5 mg/ml 300 mg/ml
Dropout++ (10x)	Dropout-5 (10x) Adenin Histidin Leucin Tryptophan Uracil	0,5 g/l 0,5 g/l 1 g/l 1 g/l 0,5 g/l

## MATERIAL

---

Dropout-5 (10x)	Alanin	0,5 g/l
	Arginin	0,5 g/l
	Asparagin	0,5 g/l
	Aspartat	1 g/l
	Cystein	0,5 g/l
	Glutamin	0,5 g/l
	Glutamat	1 g/l
	Glycin	0,5 g/l
	(myo-)Inositol	0,5 g/l
	Isoleucin	0,5 g/l
	Lysin	0,5 g/l
	Methionin	0,5 g/l
	p-Aminobenzoesäure	50 mg/l
	Phenylalanin	0,5 g/l
	Prolin	0,5 g/l
	Serin	1 g/l
	Threonin	1 g/l
	Tyrosin	0,5 g/l
	Valin	1 g/l

→ über Nacht gelöst, dann sterilfiltriert

138	EasyPrep-Puffer	Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
		EDTA	1 mM
		Saccharose	15 % (w/v)
		Lysozym	2 mg/ml
		RNase A	0,2 mg/ml
		BSA	0,1 mg/ml
		→ bei -20 °C aufbewahrt	

F1-Puffer (aus JETSPIN Kit)	Tris/HCl, pH 8.0	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase (DNAase frei)	100 µg/ml

F2-Puffer (aus JETSPIN Kit)	NaOH	200 mM
	SDS	1 %

F3-Puffer (aus JETSPIN Kit) enthält Acetat und Guanidinhydrochlorid

F4-Puffer (aus JETSPIN Kit)	Tris/HCl pH 7.5	33,3 mM
	NaCl	167 mM
	EDTA	0,33 mM

30 ml dieser Lösung mit 70 ml 100 % Ethanol zum fertigen Puffer mischen

LSB (Lämmli Auftragspuffer, 2x)	Tris/HCl, pH 6,8	120 mM
	SDS	40 mg/ml
	Glycerin	200 mg/ml
	Bromphenolblau	400 µg/ml
	β-Mercaptoethanol	10 %
LRB (Lämmli Laufpuffer, 10x)	Tris-Base	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	10 g/l
Turbo-LRB (Lämmli Laufpuffer, 10x)	Tris-Base	250 mM
	Glycin	9,46 M
	SDS	10 g/l
Mounting-Medium	Glycerin	900 mg/ml
	PBS	0,1 %
	p-Phenylendiamin	1 mg/ml
	DAPI	100 µg/ml
Novozym-Lösung	Sorbitol	1 M
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	50 mM
	Novozym	2 mg/ml
PBS-Puffer	NaCl	100 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 mM
	→ mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt	
Ponceau S	Ponceau S	1 g
	Eisessig	50 ml
	Wasser	ad 1 l
Puffer B	Sorbitol	1,2 M
	Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5)	100 mM
Puffer 3	NaCl	150 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	NaF	50 mM
	EDTA	5 mM
	Igpal CA-630	0,1 %

## MATERIAL

---

Puffer 3-D (ohne Detergenz)	NaCl	150 mM
	Tris/HCl, pH 7,5	50 mM
	NaF	50 mM
	β-Glycerophosphat	60 mM

RNase A	RNase A	10 mg/ml
	Tris/HCl, pH 7,5	10 mM
	NaCl	15 mM

→ 15 min gekocht, langsam abgekühlt

### SDS-PAGE:

Sammelgel (1 Stück)	Wasser	1,5 ml
	0,5 M Tris/Cl pH 6.8	625 µl
	Acrylamid-Mix	335 µl
	10 % SDS	25 µl
	10 % APS	25 µl
	TEMED	2,5 µl

Trenngel 7 % (1 Stück)	Wasser	3,58 ml
	1,5 M Tris/Cl pH 8.8	1,75 ml
	Acrylamid-Mix	1,6 ml
	10 % SDS	70 µl
	10 % APS	40 µl
	TEMED	5 µl

Trenngel 9 % (1 Stück)	Wasser	2,6 ml
	1,5 M Tris/Cl pH 8.8	1,5 ml
	Acrylamid-Mix	1,8 ml
	10 % SDS	60 µl
	10 % APS	36,5 µl
	TEMED	3,65 µl

Für andere Prozentigkeiten wurden ebenso wie für das beschriebene Protokoll die Angaben aus Molecular Cloning - A Laboratory Manual herangezogen (Maniatis *et al.*, 1989)

TAE (50x)	Tris/Acetat, pH 8,0	2 M
	EDTA	50 mM
	TBS (10x) Tris/HCl, pH 7,6	200 mM
	NaCl	1,37 M

TBS (10x)	Tris-Base	200 mM
	NaCl	1,37 M
	→ pH 7,6 mit HCl eingestellt	

---

TBS-T	TBS (10x) Tween 20 (10 %) Wasser	100 ml 10 ml ad 1 l
TE (10x)	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA	100 mM 10 mM
TE/SDS	Tris/HCl, pH 7,5 EDTA SDS	10 mM 1 mM 1 %
Transferpuffer	Glycin Tris-Base SDS (10 %) Methanol Wasser	2,9 g 5,8 g 3,7 ml 100 ml ad 1 l
Zuckerlösungen	20 % Glucose-Lösung wurde autoklaviert, alle anderen Zuckerlösungen (20 % Galaktose und 10 % Raffinose) wurden sterilfiltriert.	

## 8.8 Oligonukleotide

Tabelle 8.1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz/Zweck
WS0826	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG <i>MAT</i> -Lokus-PCR (Huxley <i>et al.</i> , 1990)
WS0827	GCACGGAATATGGGACTACTTCG <i>MAT</i> -Lokus-PCR, $\alpha$ -spezifisch (Huxley <i>et al.</i> , 1990)
WS0828	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG <i>MAT</i> -Lokus-PCR, $\alpha$ -spezifisch (Huxley <i>et al.</i> , 1990)
WS0972	GACCTTGAAAAAGAGCTGGAGTTTGGATTAGATAGAAAATAT TTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SLT2</i> mittels pFA6-System
WS0973	AAGCTTACATCTATGGTGATTCTATACTTCCCCGGTACTTAT AG GAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>SLT2</i> mittels pFA6-System
WS1008	GATAACGGCACGCTTCTAGACCTTG 5'-Primer zur Überprüfung der Epitopmarkierung von <i>SLT2</i>
WS1067	GGTGTGGTCAAGAGGTCATTGACTCTTCCTGTCGGTATGAAAA TTTCGGATCCCCGGGTTAATTAA 5'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>YPL158c</i> mittels pFA6-System
WS1068	GTTGATACGTTGATTTATATTAATATTAATGAATGCAAACCTTA TGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3'-Primer für die C-terminale Epitopmarkierung von <i>YPL158c</i> mittels pFA6-System
WS1069	GCCTACTCAAACAGCATTATATCGC 5'-Primer zur Überprüfung der Epitopmarkierung von <i>YPL158c</i>

Oligonukleotid	Sequenz/Zweck
WS1127	CGCGGATCCATGATCATCAGAGCTCCAATAAGGAC 5'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1128	GCGCAAGCTTTTAAATTTTCATACCGACAGGAAGAGTC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> mit <i>Hind</i> III Schnittstelle nach dem <i>TAA</i> Stopcodon
WS1201	CGCGGATCCATGGATTTTAAATTCCCGTCTAACGAAAG 5'-Primer für die Amplifikation eines N-terminal um 18 Aminosäuren verkürzten <i>YPL158c</i> mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1202	CGCGGATCCATGTCTTCACCACGTATTGTAATCAATC 5'-Primer für die Amplifikation eines N-terminal um 97 Aminosäuren verkürzten <i>YPL158c</i> mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle vor dem eingefügten <i>ATG</i> Startcodon
WS1203	GCGCAAGCTTTAGGCATCATTGTTCAATAATTTGATCAG 5'-Primer für die Amplifikation <i>pYPL158c-YPL158c-MYC13</i> mit <i>Hind</i> III Schnittstelle 610 bp vor dem <i>ATG</i> Startcodon
WS1204	GCTCTAGAGGCAAGCTAAACAGATCTATATTACCC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>pYPL158c-YPL158c-MYC13</i> mit <i>Xba</i> I Schnittstelle nach <i>T<sub>ADH</sub></i> des pFA6-Systems
WS1264	GCGCAAGCTTTTAATATGAAAACAGTCTTCTTCTTAAAAC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c 1-308</i> mit <i>Hind</i> III Schnittstelle nach eingefügtem <i>TAA</i> Stopcodon
WS1265	CGCGGATCC ATG AATGTTCAAAAGGTCCCCTCCG 5'-Primer für die Amplifikation <i>YPL158c 309-758</i> mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle vor eingefügtem <i>ATG</i> Startcodon
WS1266	GCGC AAGCTT TTA TGCGGTTAGGATGGATGCAGC 3'-Primer für die Amplifikation aus von <i>YPL158c 1-432</i> mit <i>Hind</i> III Schnittstelle nach eingefügtem <i>TAA</i> Stopcodon

Oligonukleotid	Sequenz/Zweck
WS1267	CGCGGATCCATG TCTGCCACTATGACACCGGC 5'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> 433-758 mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle vor eingefügtem <i>ATG</i> Startcodon
WS1326	GCGCAAGCTTTTAAACTCTGTCCTTATTATCTACTTCC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> 1-555 mit <i>Hind</i> III Schnittstelle nach eingefügtem <i>TAA</i> Stopcodon
WS1327	CGCGGATCCATGGAATGCAACAATGAAATTCAAAATG 5'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> 556-758 mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle vor eingefügtem <i>ATG</i> Startcodon
WS1348	CGCGGATCCGGTCTCGAATTCATGATCATCAGAGCTCCAATA AGGAC 5'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> mit <i>Bam</i> HI, <i>Bsa</i> I und <i>Eco</i> RI Schnittstellen <i>ATG</i> Startcodon zur Klonierung in pEG202 und in pJK202 vor, <i>Bsa</i> I erzeugt <i>Eco</i> RI-Überhang (Dovetail)
144   WS1349	GCGCAAGCTTGGTCTCCTCGAGTTAAATTTTCATACCGACAGG AAGAGTC 3'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> mit Schnittstellen <i>Hind</i> III, <i>Bsa</i> I und <i>Xho</i> I Schnittstellen nach <i>TAA</i> Stopcodon zur Klonierung in pEG202 und in pJK202, <i>Bsa</i> I erzeugt <i>Xho</i> I -Überhang (Dovetail)
WS1352	GCGCAAGCTTTTAGCTCTTATAATTTTGTATACGAGCAAT 3'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> 1-606 mit <i>Hind</i> III Schnittstelle nach eingefügtem <i>TAA</i> Stopcodon
WS1353	CGCGGATCCATGAATGTTGTTTATATGAATAAATCAGCAG 5'-Primer für die Amplifikation von <i>YPL158c</i> 607-758 mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle vor eingefügtem <i>ATG</i> Startcodon

## 8.9 Plasmide

**Tabelle 8.2** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

(Sammlung: Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Quelle
pWS257	<i>pep4Δ::HIS3</i>	Bluescript KS	Dieter Wolf
pWS1428	<i>pTEF2-MYC3-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1097	<i>pFA6::natMX4</i>	pAG25	(Goldstein <i>et al.</i> , 1999)
pWS1470	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1671	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-98-758-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1672	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-19-758-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1774	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-1-308-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1775	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-309-758-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1776	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-1-432-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1777	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-433-758-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1838	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-1-555-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1839	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-556-758-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1895	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-309-555-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1896	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-433-555-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1979	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-1-606-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1980	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-607-758-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1981	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-309-606-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1982	<i>pTEF2-MYC3-YPL158c-433-606-tCYC1</i>	pRS316	diese Arbeit
pWS1984	<i>BD-NLS-YPL158c</i>	pJK202	diese Arbeit
pFA6a	Vektor für die PCR-vermittelte Epitopmarkierung	pAG25	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)

Plasmid	Beschreibung	Vektor	Quelle
pJG4-5	2 $\mu$ , <i>TRP1 pGAL1-NLS-Transkriptionsaktivierungsdomäne-HA-tADH</i>		Sammlung
pJK202	2 $\mu$ , <i>HIS3 pADH-lexA-tADH, NLS</i>	pEG202	Roger Brent (Golemis <i>et al.</i> , 1995)
pRS316	<i>ARS-CEN-URA3</i>		Sammlung
pWO139	<i>pep4<math>\Delta</math>::URA3</i>	pBluescriptKS	Sammlung
pZV77	<i>bar1<math>\Delta</math>::LEU2</i>	pZV77	Sammlung

## 8.10 Hefestämme

**Tabelle 8.3 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme**

(SH: Stammhintergrund, Sammlung: Stammsammlung der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Seufert)

146 |

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
BY4741	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0</i>	S288C	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0</i>	S288C	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4743	<i>MATa/<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0 MET/met15<math>\Delta</math>0 LYS2/lys2<math>\Delta</math>0</i>	S288C	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
K699	<i>MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
K700	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3,-112 trp1-1 ura3-2 ssd1</i>	W303	Sammlung
W276	<i>MATa his3, trp1, ura3-52::URA3-lexA-op?lacZ, leu2::pLEU2-lexA-op</i>	EGY48	Sammlung
W2914	<i>pGAL-CLN2-HA3-LEU2</i>	W303	Sammlung

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W3076	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 met15-<math>\Delta</math>0 lys-<math>\Delta</math>0</i> <i>can1<math>\Delta</math>::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2</i>	S288C	Sammlung
W3736	<i>MAT<math>\alpha</math> swi5<math>\Delta</math>::natMX4</i> <i>can1<math>\Delta</math>::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2</i>	S288C	Sammlung
W4274	<i>MATa SLT2-MYC13-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4275	<i>MAT<math>\alpha</math> slt2<math>\Delta</math>::natMX4</i> <i>can1<math>\Delta</math>::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2</i>	S288c	diese Arbeit
W4335	<i>MATa SLT2-HA3-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4432	<i>MATa SIC1-MYC13-HisMX6</i>	W303	Sammlung
W4440	<i>MATa SIC1-MYC13-natMX4 swi5<math>\Delta</math>::HIS5sp</i>	W303	Sammlung
W4459	<i>MAT<math>\alpha</math> SLT2-MYC13-HIS3MX6 swi5<math>\Delta</math>::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W4460	<i>MATa SLT2-HA3-HIS3MX6 swi5<math>\Delta</math>::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W4592	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4648	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6 swi5<math>\Delta</math>::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W4804	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6</i>	W303	diese Arbeit
W4829	<i>MATa pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1-URA3</i> <i>slt2<math>\Delta</math>::natMX4</i> (pWS1470)	S288C	diese Arbeit
W4830	<i>MATa SWI5-MYC13-URA3</i>	S288c	diese Arbeit
W4956	<i>MATa ypl158c<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W4974	<i>MATa SLT2-MYC13-HIS3MX6 ypl158c<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W4976	<i>MATa SLT2-HA3-HIS3MX6 ypl158c<math>\Delta</math>::kanMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W5073	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6</i> <i>MYO1-HA3-natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W5117	<i>MATa YPL158c-MYC13-natMX4 bar1<math>\Delta</math>::LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5120	<i>MATa YPL158c-MYC13-natMX4</i> <i>bar1<math>\Delta</math>::LEU2 swi5<math>\Delta</math>::HIS3</i>	W303	diese Arbeit
W5204	<i>MATa MYO1-MYC13-HIS3MX6 ypl158c<math>\Delta</math>::kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W5322	<i>MATa /α YPL158c-MYC13-HIS3MX6 / YPL158c-MYC13-HIS3MX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5538	<i>MATa ypl158cΔ::natMX4</i>	S288C	diese Arbeit
W5585	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6 chs1Δ::kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5586	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6 chs1Δ::kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5587	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6 chs3Δ::kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5588	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6 chs3Δ::kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5589	<i>MATa YPL158c-MYC13-HIS3MX6 cts1Δ::kanMX6</i>	S288C	diese Arbeit
W5735	<i>MATα ypl158cΔ::natMX4 can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFAalpha1pr-LEU2</i>	S288C	diese Arbeit
W5849	<i>MATa YPL158c-MYC13-HisMX6 pGAL-CLN2-HA3-LEU2</i>	W303	diese Arbeit
W5853	<i>MATa swi5Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W5854	<i>MATa ypl158cΔ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6018	<i>MATa cts1Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6019	<i>MATa skt5Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6020	<i>MATa dse2Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6021	<i>MATa egt2Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6022	<i>MATa scw11Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6023	<i>MATa skm1Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6024	<i>MATa chs1Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6025	<i>MATa chs3Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6026	<i>MATa dse1Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6029	<i>MATa eng1Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf
W6158	<i>MATa bck1Δ::kanMX4</i>	S288C	Euroscarf

Stamm	Relevanter Genotyp	SH	Quelle
W6188	<i>MATa pADH-NLS-YPL158c-HIS his3, trp1, ura3-52::URA3-lexA-op-lacZ, leu2::pLEU2-lexA-op</i>	EGY48	diese Arbeit
W6267	<i>MATa pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1</i> (pWS1470)	S288C	diese Arbeit
W6271	<i>MATa pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1 ypl158cΔ::kanMX6</i> (pWS1470)	S288C	diese Arbeit
W6279	<i>MATa pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1 SLT2-HA3-HisMX6</i> (pWS1470)	S288c	diese Arbeit
W6283	<i>MATa pTEF2-MYC3-YPL158c-tCYC1 SLT2-HA3-HIS3MX6 ypl158cΔ::kanMX6</i> (pWS1470)	S288C	diese Arbeit
W6688	<i>MATa bni1Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf
W6690	<i>MATa chs6Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf
W6691	<i>MATa chs5Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf
W6692	<i>MATa hof1Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf
W6693	<i>MATa bnr1Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf
W6696	<i>MATa bni4Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf
W6697	<i>MATa chs7Δ::kanMX4</i>	S288c	Euroscarf
W6803	<i>MATa YPL158c-MYC13-natMX4 bar1Δ::LEU2 pep4Δ::URA3</i>	W303	diese Arbeit

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, A.E., und J.R. Pringle. 1991. Staining of actin with fluorochrome-conjugated phalloidin. *Methods Enzymol.* 194:729-31.
- Adams, D.J. 2004. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology.* 150:2029-2035.
- Aerne, B.L., A.L. Johnson, J.H. Toyn, und L.H. Johnston. 1998. Swi5 controls a novel wave of cyclin synthesis in late mitosis. *Mol Biol Cell.* 9:945-56.
- Akada, R., T. Murakane, und Y. Nishizawa. 2000. DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. *Biotechniques.* 28:668-70, 672, 674.
- Amon, A. 1996. Mother and daughter are doing fine: asymmetric cell division in yeast. *Cell.* 84:651-4.
- Amon, A. 2002. Synchronization procedures. *Methods Enzymol.* 351:457-67.
- Amon, A., S. Irniger, und K. Nasmyth. 1994. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell.* 77:1037-50.
- Armstrong, D.J., und A. Roman. 1993. The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem Biophys Res Commun.* 192:1380-7.
- Bai, C., P. Sen, K. Hofmann, L. Ma, M. Goebel, J.W. Harper, und S.J. Elledge. 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell.* 86:263-74.
- Bardin, A.J., und A. Amon. 2001. Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:815-26.
- Bardin, A.J., R. Visintin, und A. Amon. 2000. A mechanism for coupling exit from mitosis to partitioning of the nucleus. *Cell.* 102:21-31.
- Baumeister, W., J. Walz, F. Zuhl, und E. Seemuller. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell.* 92:367-80.
- Benton, B.K., A. Tinkelenberg, I. Gonzalez, und F.R. Cross. 1997. Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol Cell Biol.* 17:5067-76.
- Berghammer, H., und B. Auer. 1993. "Easypreps": fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques.* 14:524, 528.
- Bhoite, L.T., Y. Yu, und D.J. Stillman. 2001. The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev.* 15:2457-69.
- Bi, E. 2001. Cytokinesis in budding yeast: the relationship between actomyosin ring function and septum formation. *Cell Struct Funct.* 26:529-37.
- Bi, E., P. Maddox, D.J. Lew, E.D. Salmon, J.N. McMillan, E. Yeh, und J.R. Pringle. 1998. Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol.* 142:1301-12.
- Bobola, N., R.P. Jansen, T.H. Shin, und K. Nasmyth. 1996. Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell.* 84:699-709.
- Bolay, H. 2003. Genetische Interaktionen mit Swi5, einem Transkriptionsfaktor im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Institut für Industrielle Genetik*. Universität Stuttgart.
- Brachmann, C.B., A. Davies, G.J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter, und J.D. Boeke. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* . 14:115-32.
- Bulik, D.A., M. Olczak, H.A. Lucero, B.C. Osmond, P.W. Robbins, und C.A. Specht. 2003. Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryot Cell.* 2:886-900.
- Cabib, E. 2004. The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 426:201-207.
- Cabib, E., D.H. Roh, M. Schmidt, L.B. Crotti, und A. Varma. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem.* 276:19679-82.
- Cairns, B.R., Y.J. Kim, M.H. Sayre, B.C. Laurent, und R.D. Kornberg. 1994. A multisubunit complex containing the SWI1/ADR6, SWI2/SNF2, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:1950-4.
- Calzada, A., M. Sacristan, E. Sanchez, und A. Bueno. 2001. Cdc6 cooperates with Sic1 and Hct1 to inactivate mitotic cyclin-dependent kinases. *Nature.* 412:355-8.
- Chang, F. 1993. Stop that cell cycle. *Curr Biol.* 3:693-695.
- Chant, J. 1999. Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:365-91.
- Chant, J., M. Mischke, E. Mitchell, I. Herskowitz, und J.R. Pringle. 1995. Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *J Cell Biol.* 129:767-78.
- Chen, R.E., und J. Thorner. 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1773:1311-40.

- Cid, V.J., L. Adamikova, M. Sanchez, M. Molina, and C. Nombela. 2001. Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology*. 147:1437-50.
- Cid, V.J., A. Duran, F. del Rey, M.P. Snyder, C. Nombela, and M. Sanchez. 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 59:345-86.
- Clarke, D.J., and J.F. Gimenez-Abian. 2000. Checkpoints controlling mitosis. *Bioessays*. 22:351-63.
- Coates, J.C. 2003. Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol*. 13:463-71.
- Collister, M., M.P. Didmon, F. MacIsaac, M.J. Stark, N.Q. MacDonald, and S.M. Keyse. 2002. YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slr2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett*. 527:186-92.
- Cosma, M.P., T. Tanaka, and K. Nasmyth. 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*. 97:299-311.
- Cryer, D.R., R. Eccleshall, and J. Marmur. 1975. Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol*. 12:39-44.
- de Nobel, H., C. Ruiz, H. Martin, W. Morris, S. Brul, M. Molina, and F.M. Klis. 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*. 146 ( Pt 9):2121-32.
- DeMarini, D.J., A.E.M. Adams, H. Fares, C.D. Virgilio, G. Valle, J.S. Chuang, and J.R. Pringle. 1997. A Septin-based Hierarchy of Proteins Required for Localized Deposition of Chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *J. Cell Biol*. 139:75-93.
- Deshaies, R.J. 1997. Phosphorylation and proteolysis: partners in the regulation of cell division in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev*. 7:7-16.
- Dirick, L., T. Bohm, and K. Nasmyth. 1995. Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*. 14:4803-13.
- Dobbelaere, J., and Y. Barral. 2004. Spatial Coordination of Cytokinetic Events by Compartmentalization of the Cell Cortex. *Science*. 305:393-396.
- Dohrmann, P.R., G. Butler, K. Tamai, S. Dorland, J.R. Greene, D.J. Thiele, and D.J. Stillman. 1992. Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase. *Genes Dev*. 6:93-104.
- Doi, K., A. Gartner, G. Ammerer, B. Errede, H. Shinkawa, K. Sugimoto, and K. Matsumoto. 1994. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *Embo J*. 13:61-70.
- Doolin, M.T., A.L. Johnson, L.H. Johnston, and G. Butler. 2001. Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol*. 40:422-32.
- Dumitrescu, T.P., and W.S. Saunders. 2002. The FEAR Before MEN: networks of mitotic exit. *Cell Cycle*. 1:304-7.
- Evan, G.I., G.K. Lewis, G. Ramsay, and J.M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*. 5:3610-6.
- Evans, T., E.T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 33:389-96.
- Faty, M., M. Fink, and Y. Barral. 2002. Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet*. 41:123-31.
- Field, J., J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I.A. Wilson, R.A. Lerner, and M. Wigler. 1988. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol*. 8:2159-65.
- Fields, S., and R. Sternglanz. 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*. 10:286-92.
- Fitch, I., C. Dahmann, U. Surana, A. Amon, K. Nasmyth, L. Goetsch, B. Byers, and B. Futcher. 1992. Characterization of four B-type cyclin genes of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. 3:805-818.
- Flandez, M., I.C. Cosano, C. Nombela, H. Martin, and M. Molina. 2004. Reciprocal Regulation between Slr2 MAPK and Isoforms of Msg5 Dual-specificity Protein Phosphatase Modulates the Yeast Cell Integrity Pathway. *J. Biol. Chem*. 279:11027-11034.
- Fujimura, H., and Y. Sakuma. 1993. Simplified isolation of chromosomal and plasmid DNA from yeasts. *Biotechniques*. 14:538-40.
- Gietz, R.D., and R.A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*. 350:87-96.
- Gladfelter, A.S., J.R. Pringle, and D.J. Lew. 2001. The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr Opin Microbiol*. 4:681-9.
- Goffeau, A., B.G. Barrell, H. Bussey, R.W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J.D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E.J. Louis, H.W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S.G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science*. 274:546, 563-7.
- Goldstein, A.L., and J.H. McCusker. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15:1541-53.

- Golemis, E.A., J. Gyuris, und R. Brent. 1995. Interaction trap/two-hybrid system to identify protein interactions. *Current protocols in molecular biology*:13.14.1–13.14.17.
- Guarente, L. 1993. Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends Genet.* 9:362-6.
- Gustin, M.C., J. Albertyn, M. Alexander, und K. Davenport. 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1264-300.
- Haase, S.B., und D.J. Lew. 1997. Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast. *Methods Enzymol.* 283:322-32.
- Hahn, J.S., und D.J. Thiele. 2002. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slit2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem.* 277:21278-84.
- Harbison, C.T., D.B. Gordon, T.I. Lee, N.J. Rinaldi, K.D. Macisaac, T.W. Danford, N.M. Hannett, J.B. Tagne, D.B. Reynolds, J. Yoo, E.G. Jennings, J. Zeitlinger, D.K. Pokholok, M. Kellis, P.A. Rolfe, K.T. Takusagawa, E.S. Lander, D.K. Gifford, E. Fraenkel, und R.A. Young. 2004. Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature.* 431:99-104.
- Hartman, J.L.t., B. Garvik, und L. Hartwell. 2001. Principles for the buffering of genetic variation. *Science.* 291:1001-4.
- Hartwell, L.H., und T.A. Weinert. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246:629-34.
- Heinisch, J.J., A. Lorberg, H.P. Schmitz, und J.J. Jacoby. 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 32:671-80.
- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* 52:536-53.
- Hildebrandt, E.R., und M.A. Hoyt. 2000. Mitotic motors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1496:99-116.
- Hohmann, S. 2002. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:300-372.
- Huh, W.K., J.V. Falvo, L.C. Gerke, A.S. Carroll, R.W. Howson, J.S. Weissman, und E.K. O'Shea. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* 425:686-91.
- Huxley, C., E.D. Green, und I. Dunham. 1990. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.* 6:236.
- Irie, K., M. Takase, K.S. Lee, D.E. Levin, H. Araki, K. Matsumoto, und Y. Oshima. 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.
- Jacoby, T., H. Flanagan, A. Faykin, A.G. Seto, C. Mattison, und I. Ota. 1997. Two Protein-tyrosine Phosphatases Inactivate the Osmotic Stress Response Pathway in Yeast by Targeting the Mitogen-activated Protein Kinase, Hog1. *J. Biol. Chem.* 272:17749-17755.
- Jung, U.S., und D.E. Levin. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol.* 34:1049-57.
- King, R.W., R.J. Deshaies, J.M. Peters, und M.W. Kirschner. 1996. How Proteolysis Drives the Cell Cycle. *Science.* 274:1652-1659.
- Knapp, D., L. Bhoite, D.J. Stillman, und K. Nasmyth. 1996. The transcription factor Swi5 regulates expression of the cyclin kinase inhibitor p40SIC1. *Mol Cell Biol.* 16:5701-7.
- Korinek, W.S., E. Bi, J.A. Epp, L. Wang, J. Ho, und J. Chant. 2000. Cyk3, a novel SH3-domain protein, affects cytokinesis in yeast. *Curr Biol.* 10:947-50.
- Kostriken, R., J.N. Strathern, A.J. Klar, J.B. Hicks, und F. Heffron. 1983. A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.* 35:167-74.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lee, K.K., P. Prochasson, L. Florens, S.K. Swanson, M.P. Washburn, und J.L. Workman. 2004. Proteomic analysis of chromatin-modifying complexes in *Saccharomyces cerevisiae* identifies novel subunits. *Biochem Soc Trans.* 32:899-903.
- Lee, K.S., K. Irie, Y. Gotoh, Y. Watanabe, H. Araki, E. Nishida, K. Matsumoto, und D.E. Levin. 1993. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 13:3067-75.
- Lee, K.S., und D.E. Levin. 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.
- Lesage, G., und H. Bussey. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70:317-43.
- Lesage, G., J. Shapiro, C.A. Specht, A.M. Sdicu, P. Menard, S. Hussein, A.H. Tong, C. Boone, und H. Bussey. 2005. An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* 6:8.

- Levin, D.E. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69:262-91.
- Levin, D.E., F.O. Fields, R. Kunisawa, J.M. Bishop, and J. Thorner. 1990. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell.* 62:213-24.
- Lew, D., and S. Reed. 1993a. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* 120:1305-1320.
- Lew, D.J., and S.I. Reed. 1993b. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol.* 120:1305-20.
- Lew, D.J., T. Weinert, and J.R. Pringle. 1997. Cell Cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* Yeast III:607-695.
- Lippincott, J., and R. Li. 1998a. Dual function of Cyk2, a cdc15/PSTPIP family protein, in regulating actomyosin ring dynamics and septin distribution. *J Cell Biol.* 143:1947-60.
- Lippincott, J., and R. Li. 1998b. Sequential Assembly of Myosin II, an IQGAP-like Protein, and Filamentous Actin to a Ring Structure Involved in Budding Yeast Cytokinesis. *J. Cell Biol.* 140:355-366.
- Longhese, M.P., M. Foiani, M. Muzi-Falconi, G. Lucchini, and P. Plevani. 1998. DNA damage checkpoint in budding yeast. *Embo J.* 17:5525-8.
- Longtine, M.S., and E. Bi. 2003. Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol.* 13:403-9.
- Longtine, M.S., D.J. DeMarini, M.L. Valencik, O.S. Al-Awar, H. Fares, C. De Virgilio, and J.R. Pringle. 1996. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol.* 8:106-19.
- Longtine, M.S., A. McKenzie, 3rd, D.J. Demarini, N.G. Shah, A. Wach, A. Brachet, P. Philippsen, and J.R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14:953-61.
- Madden, K., Y.J. Sheu, K. Baetz, B. Andrews, and M. Snyder. 1997. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science.* 275:1781-4.
- Maniatis, T., J. Sambrook, and E.F. Fritsch. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Manning, B.D., R. Padmanabha, and M. Snyder. 1997. The Rho-GEF Rom2p Localizes to Sites of Polarized Cell Growth and Participates in Cytoskeletal Functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 8:1829-1844.
- Martin, H., J. Arroyo, M. Sanchez, M. Molina, and C. Nombela. 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue Slr2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol Gen Genet.* 241:177-84.
- Martin, H., M.C. Castellanos, R. Cenamor, M. Sanchez, M. Molina, and C. Nombela. 1996. Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLT2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants. *Curr Genet.* 29:516-22.
- Martin, H., J.M. Rodriguez-Pachon, C. Ruiz, C. Nombela, and M. Molina. 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275:1511-9.
- Mazzoni, C., P. Zarov, A. Rambourg, and C. Mann. 1993. The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 123:1821-33.
- Mendenhall, M.D. 1993. An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science.* 259:216 - 219.
- Mendenhall, M.D., and A.E. Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1191-243.
- Moll, T., G. Tebb, U. Surana, H. Robertsch, and K. Nasmyth. 1991. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SW15. *Cell.* 66:743-58.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature.* 374:131-4.
- Morgan, D.O. 2007. *The Cell Cycle: Principles of Control.* New Science Press Ltd., London.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.
- Murray, A.W., and M.W. Kirschner. 1989. Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science.* 246:614-21.
- Nasmyth, K. 1993. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol.* 5:166-79.
- Nasmyth, K. 1996. At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet.* 12:405-12.
- Nasmyth, K., G. Adolf, D. Lydall, and A. Seddon. 1990. The identification of a second cell cycle control on the HO promoter in yeast: cell cycle regulation of SW15 nuclear entry. *Cell.* 62:631-47.
- Nasmyth, K., A. Seddon, and G. Ammerer. 1987. Cell cycle regulation of SW15 is required for mother-cell-specific HO transcription in yeast. *Cell.* 49:549-58.
- Nonaka, H., K. Tanaka, H. Hirano, T. Fujiwara, H. Kohno, M. Umikawa, A. Mino, and Y. Takai. 1995. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* 14:5931-8.

- Norden, C., M. Mendoza, J. Dobbelaere, C.V. Kotwaliwale, S. Biggins, and Y. Barral. 2006. The NoCut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage. *Cell*. 125:85-98.
- Obrig, T.G., W.J. Culp, W.L. McKeehan, and B. Hardesty. 1971. The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem*. 246:174-81.
- Patton, E.E., A.R. Willems, and M. Tyers. 1998. Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis. *Trends Genet*. 14:236-43.
- Peifer, M., S. Berg, and A.B. Reynolds. 1994. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*. 76:789-91.
- Peters, J.M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*. 9:931-43.
- Peterson, C.L., A. Dingwall, and M.P. Scott. 1994. Five SWI/SNF gene products are components of a large multisubunit complex required for transcriptional enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:2905-8.
- Philip, B., and D.E. Levin. 2001. Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol*. 21:271-80.
- Pringle, J.R., A.E. Adams, D.G. Drubin, and B.K. Haarer. 1991. Immunofluorescence methods for yeast. *Methods Enzymol*. 194:565-602.
- Pruyne, D., and A. Bretscher. 2000a. Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci*. 113 ( Pt 4):571-85.
- Pruyne, D., and A. Bretscher. 2000b. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci*. 113 ( Pt 3):365-75.
- Rechsteiner, M., and S.W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*. 21:267-271.
- Rogers, S.W., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*. 234:364-368.
- Roncero, C., M.H. Valdivieso, J.C. Ribas, and A. Duran. 1988. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J Bacteriol*. 170:1950-4.
- Schmidt, M., B. Bowers, A. Varma, D.-H. Roh, and E. Cabib. 2002. In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J Cell Sci*. 115:293-302.
- Schwab, M., A.S. Lutum, and W. Seufert. 1997. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell*. 90:683-93.
- Schwob, E., T. Bohm, M.D. Mendenhall, and K. Nasmyth. 1994. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*. 79:233-44.
- Simon, I., J. Barnett, N. Hannett, C.T. Harbison, N.J. Rinaldi, T.L. Volkert, J.J. Wyrick, J. Zeitlinger, D.K. Gifford, T.S. Jaakkola, and R.A. Young. 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell*. 106:697-708.
- Spellman, P.T., G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein, and B. Futcher. 1998. Comprehensive Identification of Cell Cycle-regulated Genes of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* by Microarray Hybridization. *Mol. Biol. Cell*. 9:3273-3297.
- Stegmeier, F., and A. Amon. 2004. Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu Rev Genet*. 38:203-32.
- Stegmeier, F., R. Visintin, and A. Amon. 2002. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase. *Cell*. 108:207-20.
- Stern, M., R. Jensen, and I. Herskowitz. 1984. Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. *Journal of Molecular Biology*. Volume 178:853-868.
- Tkacz, J.S., E.B. Cybulska, and J.O. Lampen. 1971. Specific Staining of Wall Mannan in Yeast Cells with Fluorescein-Conjugated Concanavalin A. *J. Bacteriol*. 105:1-5.
- Tolliday, N., M. Pitcher, and R. Li. 2003. Direct evidence for a critical role of myosin II in budding yeast cytokinesis and the evolvability of new cytokinetic mechanisms in the absence of myosin II. *Mol Biol Cell*. 14:798-809.
- Tong, A.H., M. Evangelista, A.B. Parsons, H. Xu, G.D. Bader, N. Page, M. Robinson, S. Raghibizadeh, C.W. Hogue, H. Bussey, B. Andrews, M. Tyers, and C. Boone. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*. 294:2364-8.
- Torres, L., H. Martin, M.I. Garcia-Saez, J. Arroyo, M. Molina, M. Sanchez, and C. Nombela. 1991. A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol*. 5:2845-54.
- Toyn, J.H., A.L. Johnson, J.D. Donovan, W.M. Toone, and L.H. Johnston. 1996. The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. *Genetics*. 145:85-96.
- Ubersax, J.A., E.L. Woodbury, P.N. Quang, M. Paraz, J.D. Blethrow, K. Shah, K.M. Shokat, and D.O. Morgan. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. 425:859-64.

- Vallen, E.A., J. Caviston, und E. Bi. 2000. Roles of Hof1p, Bni1p, Bnr1p, and Myo1p in Cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 11:593-611.
- Varshavsky, A., G. Turner, F. Du, und Y. Xie. 2000. The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem (Felix Hoppe-Seyler Lecture 2000)*. 381:779-89.
- Visintin, C., B.N. Tomson, R. Rahal, J. Paulson, M. Cohen, J. Taunton, A. Amon, und R. Visintin. 2008. APC/C-Cdh1-mediated degradation of the Polo kinase Cdc5 promotes the return of Cdc14 into the nucleolus. *Genes Dev.* 22:79-90.
- Visintin, R., K. Craig, E.S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers, und A. Amon. 1998. The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell.* 2:709-18.
- Weirich, C.S., J.P. Erzberger, und Y. Barral. 2008. The septin family of GTPases: architecture and dynamics. 9:478-489.
- Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:169-78.
- Wheeler, R.T., und G.R. Fink. 2006. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog.* 2:e35.
- Wong, J., Y. Nakajima, S. Westermann, C. Shang, J.S. Kang, C. Goodner, P. Houshmand, S. Fields, C.S. Chan, D. Drubin, G. Barnes, und T. Hazbun. 2007. A protein interaction map of the mitotic spindle. *Mol Biol Cell.* 18:3800-9.
- Wurgler-Murphy, S.M., T. Maeda, E.A. Witten, und H. Saito. 1997. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol.* 17:1289-97.
- Ye, P., B.D. Peysen, X. Pan, J.D. Boeke, F.A. Spencer, und J.S. Bader. 2005. Gene function prediction from congruent synthetic lethal interactions in yeast. *Mol Syst Biol.* 1:2005 0026.
- Yeong, F.M. 2005. Severing all ties between mother and daughter: cell separation in budding yeast. *Molecular Microbiology.* 55:1325-1331.
- Zarrov, P., C. Mazzoni, und C. Mann. 1996. The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *Embo J.* 15:83-91.
- Zhan, X.L., R.J. Deschenes, und K.L. Guan. 1997. Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11:1690-702.
- Ziman, M., J. Chuang, und R. Schekman. 1996. Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell.* 7:1909-1919.

# 10 ANHANG

## 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1	Lebenszyklus der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
Abbildung 3.2	Schema des Zellzyklus in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	23
Abbildung 3.3	Modell des FEAR und MEN am Ende der Mitose.....	29
Abbildung 3.4	Modell zur Regulation der <i>HO</i> -Transkription.....	33
Abbildung 3.5	Modell des Zellintegritätswegs mit seinen wichtigsten Komponenten .....	40
Abbildung 3.6	Modell der Cytokinese und Zellseparation .....	43
Abbildung 5.1	Genetische Interaktionen von <i>SWI5</i> und <i>YPL158c</i> mit <i>SLT2</i> und <i>BCK1</i> .....	47
Abbildung 5.2	Wachstumstest bei 37 °C zeigt die Notwendigkeit des Zellintegritätsweges.....	49
Abbildung 5.3	Durchflusszytometrie und Knospungsindex zeigen Defekte in der Cytokinese und Zellseparation .....	51
Abbildung 5.4	ConA-FITC Färbung der Deletionsmutanten <i>swi5Δ</i> und <i>ypl158cΔ</i> zeigt Defekte in der Cytokinese und Zellseparation .....	52
Abbildung 5.5	Die Phosphorylierung von Sl2 und Aktivierung des Zellintegritätsweg ist in den Deletionsstämmen <i>swi5Δ</i> und <i>ypl158cΔ</i> erhöht .....	53
Abbildung 5.6	Konstitutive <i>YPL158c</i> -Expression supprimiert Wachstumsdefekte der Doppelmutanten .....	55
Abbildung 5.7	Konstitutive <i>YPL158c</i> -Expression supprimiert Defekte in der Cytokinese und Zellseparation..	56
Abbildung 5.8	Phosphorylierung von Sl2 und Aktivierung des Zellintegritätswegs im Deletionsstamm <i>ypl158cΔ</i> bei konstitutiver Expression von <i>YPL158c</i> unter der Kontrolle des <i>TEF2</i> -Promotors .....	58
Abbildung 5.9	Chitinfärbung mit Calcofluor White .....	59
Abbildung 5.10	Nachweis von F-Aktin mittels Fluoreszenz-markiertem Phalloidin .....	61
Abbildung 5.11	Nachweis von Ypl158c mittels indirekter Immunfluoreszenz .....	62
Abbildung 5.12	Chitinfärbung diploider Zellen mit Calcofluor White.....	64
Abbildung 5.13	Nachweis von Ypl158c und Myo1 mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	65
Abbildung 5.14	Nachweis von Septinen in <i>ypl158cΔ</i> mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	66
Abbildung 5.15	Nachweis von Myo1 und Septinen in <i>ypl158cΔ</i> mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	67
Abbildung 5.16	Nachweis von Ypl158c in verschiedenen Deletionsmutanten der Zellseparation mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	68
Abbildung 5.17	Nachweis von Ypl158c und Sic1 in Wildtyp und <i>swi5Δ</i> .....	73
Abbildung 5.18	Nachweis von Ypl158c in <i>swi5Δ</i> mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	75
Abbildung 5.19	Nachweis von Ypl158c im Zellzyklus nach dem Entlassen aus dem $\alpha$ -Faktor-Arrest .....	77
Abbildung 5.20	Nachweis von Ypl158c im Nocodazol- und Hydroxyharnstoff-Arrest .....	78
Abbildung 5.21	Nachweis von Ypl158c bei Überexpression von <i>Cln2</i> .....	81
Abbildung 5.22	Proteinstabilität von Ypl158c und <i>Swi5</i> im Cycloheximid-Abschaltexperiment.....	82
Abbildung 5.23	Nachweis von Ypl158c nach differentieller Zentrifugation in Wildtyp und <i>swi5Δ</i> .....	83
Abbildung 5.24	Multipler Sequenzvergleich von Ypl158c mit orthologen Proteinen ausgewählter Hefen .....	85

Abbildung 5.25	Schematische Darstellung hergestellter C- und N-terminaler Verkürzungen des Ypl158c Proteins.....	86
Abbildung 5.26	Nachweis der verkürzten Ypl158c-Konstrukte in der indirekten Immunfluoreszenz .....	90
Abbildung 5.27	Durchflusszytometrie bei konstitutiver Expression von C- bzw. N-terminalen Verkürzungen von <i>YPL158c</i> unter der Kontrolle des <i>TEF2</i> -Promotors in <i>ypl158cΔ</i> und <i>swi5Δ</i> Zellen.....	92
Abbildung 5.28	Nachweis der Ypl158c-Verkürzungen in der Western-Blot-Analyse .....	94
Abbildung 5.29	Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse der Ypl158c-Verkürzungen.....	95
Abbildung 6.1	Modell zur Wirkungsweise von Ypl158c.....	102
Abbildung 7.1	Schema der im Zellzyklus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durch Inhibitoren erreichbaren Arreste .....	108
Abbildung 7.2	Modell der Transkriptionsaktivierung im Zwei-Hybrid-System.....	125

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 5.1	Liste mit einigen aus der Literatur bekannten genetischen Interaktionen .....	70
Tabelle 5.2	Liste getesteter genetischer Interaktionen .....	71
Tabelle 8.1	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.....	142
Tabelle 8.2	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide .....	145
Tabelle 8.3	Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme.....	146

## 11 LEBENS LAUF

### **Persönliche Angaben:**

Name: Heidi Azucena Richter (geb. Bolay)  
Adresse: Eckehartstraße 4  
80993 München  
geboren: 29.07.1975 in Stuttgart, Bad Cannstatt  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet

### **Schulbildung**

1982 – 1986 Grundschole Stuttgart - Hofen  
1986 – 1995 Gottlieb - Daimler - Gymnasium, Abitur 1995

158 |

### **Anstellung**

06/1995 – 07/1996 Küchenhilfe in Versorgungsbetrieb Mercedes Benz AG

### **Studium**

10/1996 – 11/2003 Technische Biologie, Universität Stuttgart, Diplom

### **Diplomarbeit**

02/2003 – 11/2003 Universität Stuttgart  
Institut für Industrielle Genetik, Prof. Dr. W. Seufert  
Titel: *Genetische Interaktionen mit Swi5, einem Transkriptionsfaktor im Zellteilungszyklus der Hefe Saccharomyces cerevisiae*

**Promotion**

11/2003 – 12/2005

Universität Stuttgart

Institut für Industrielle Genetik, Prof. Dr. W. Seufert

01/2006 – 10/2008

Universität Regensburg

Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie

Lehrstuhl für Genetik, Prof. Dr. W. Seufert

Titel: *Genetische Untersuchungen zur Funktion des Knospenhalsproteins Ypl158c der Hefe Saccharomyces cerevisiae*

## DANKE

Durch ihre Hilfe und Unterstützung haben viele Menschen dazu beigetragen, dass diese Arbeit entstehen konnte. Diesen Menschen will ich hiermit danken.

Mein erster Dank gilt **Prof. Dr. Wolfgang Seufert**. Ihm möchte ich für die hervorragende Betreuung danken, für die wertvollen Diskussionen und Anregungen. Auch für die Möglichkeit an einem Kolloquium der DFG und dem Symposium zum geplanten Regensburger Zentrum für Biochemie und Biophysik teilzunehmen, möchte ich mich bedanken.

Bei **Prof. Dr. Ludwig Lehle** möchte ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit bedanken, sowie auch bei **Prof. Dr. Stephan Schneuwly**, **Prof. Dr. Thomas Dresselhaus** und **Prof. Dr. Reinhard Wirth**, weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission.

160 | Mein herzlichster Dank geht auch an alle Mitarbeiter, mit denen ich die letzten Jahre in Stuttgart und Regensburg zusammenarbeiten durfte. Ich danke den „Stuttgartern“ **Melanie Noack**, **Sylvia Osswald**, **Esther Owsianowski**, **Doreen Möcker**, **Thomas Dünnebier** und **Angie Kunert**, von denen einige mir gute Freunde geworden sind. Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für industrielle Genetik für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Den „Regensburgern“ **Veronika Meier**, **Birgit Scharf**, **Antje Machetanz-Morokane**, **Wolfgang Mages**, **Sabine Schneider** und **Andrea Brücher** danke ich für das warme Willkommen in einer neuen Umgebung. Ohne die „Mitgroastn“ **Michael Schwab**, **Jörg Reissing**, **Nicole Diergardt** und **Christine Geil** wäre mir die Eingewöhnung und die Entfernung zur Heimat sicher um einiges schwerer gefallen. Ich danke Euch! Ich möchte den vielen Studenten so wie auch den vielen Diplomanden (**Caroline Sonntag**, **Christa Bücken**, **Michaela Küpper**, **Franz Meitinger**, **Uli Heigl**, **Sabine Stöckl**, **Nicholas Putz**, **Lea Arnold** und **Britta Swoboda**) danken, dass ihnen nie die Fragen ausgegangen sind und sie den Tag immer haben bunt werden lassen.

Zuletzt, aber vor allen anderen möchte ich den Menschen danken, die mir am nächsten sind.

**Frank**, Dir danke ich für Deine Stärke und Geduld, Dein Verständnis und die Entbehrungen, Deine Unterstützung und dafür, dass Du für mich immer die Sonne scheinen lässt.

| 161

**Meinen lieben Eltern** möchte dafür danken, dass sie mich rückhaltlos unterstützt und immer dazu aufgemuntert haben, diesen Weg zu gehen.

Aber vor allem danke ich Euch für Eure Liebe.



