

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von:

Sonja Münchow
aus Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 17.Mai 2004

**Identifizierung und Charakterisierung eines
neuen Zielgenes des Transkriptionsfaktors *ASH1*
&
Charakterisierung des *Candida albicans* *ASH1*
in *Saccharomyces cerevisiae***

Gutachter: Prof.Dr. Ralf-Peter Jansen
Dr.Blanche Schwappach

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen Mittel, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Desweiteren erkläre ich hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt, beziehungsweise die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

München, April 2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> – Der Lebens- und Vegetationszyklus	5
1.3	Der Paarungstypwechsel	7
1.4	Die Kontrolle der <i>HO</i> -Expression	9
1.5	Das asymmetrische Verteilungsmuster von Ash1p	12
1.6	Die Rolle der Cylin-abhängigen Kinase <i>PHO85</i> im asymmetrischen Verteilungsmuster von Ash1p	18
1.7	Morphologische Differenzierung	20
1.8	Der humanpathogene Pilz <i>Candida albicans</i>	23
1.9	Zielsetzung der Arbeit	25
2	Ergebnisse	27
2.1	<i>Candida albicans</i> <i>ASH1</i> hat eine konservierte Funktion in der pseudohyphalen Differenzierung	28
2.2	CaAsh1p ist ein asymmetrisch lokalisiertes nukleäres Protein	31
2.3	<i>PCL5</i> mRNA, eine differentiell exprimierte mRNA	34
2.4	Myo4p hat Einfluß auf die Expression der <i>PCL5</i> mRNA unter Nahrungsmangel ..	37
2.5	Die Myo4p-abhängige Regulation der <i>PCL5</i> Expression ist diploid-spezifisch.....	41
2.6	<i>MYO4</i> reguliert die Transkription eines <i>PCL5</i> Promotor-Luziferase Reporters diploid-spezifisch	42
2.7	Der Effekt einer <i>ASH1</i> Überexpression auf die <i>PCL5</i> Expression	43
2.8	Morphologische Abnormalitäten einer <i>ash1/pcl5</i> Doppelmutante	45
2.9	Das Knospungsverhalten der <i>ash1/pcl5</i> Doppelmutante	46
2.10	Die Organisation des Aktinzytoskeletts ist gestört in einer <i>ash1/pcl5</i> Doppelmutante	47

2.11	In einem hungernden <i>myo4Δ</i> Stamm akkumulieren Zellen, die G1 überschritten haben	48
2.12	Die Expression von <i>CLN2</i> und <i>PCL1</i> ist unverändert in hungernden <i>myo4Δ</i> Zellen	50
2.13	Die Teilungsrate eines hungernden <i>myo4Δ</i> Stammes ist erhöht	52
2.14	Die erhöhte Teilungsrate ist <i>ASH1</i> -abhängig	54
2.15	Das Expressionslevel von <i>PCL5</i> korreliert mit den Überlebenschancen der Hefe unter Nährstoffmangel.....	55
2.16	Die erhöhte Teilungsrate eines <i>myo4Δ</i> Stammes ist spezifisch für Aminosäurenmangel.....	57
2.17	Pcl5p ist <i>MYO4</i> - und <i>ASH1</i> -abhängig asymmetrisch lokalisiert.....	59
2.18	Die asymmetrische Verteilung von Ash1p ist <i>PCL5</i> -abhängig	62
2.19	<i>ASH1</i> mRNA mislokalisiert in einem haploiden <i>pcl5Δ</i> Stamm.....	63
2.20	Myo4p lokalisiert an die Knospenspitze in <i>pcl5Δ</i>	65
2.21	Ist2p ist delokalisiert in <i>pcl5Δ</i>	66
2.22	In einem <i>pcl5Δ</i> Stamm ist <i>IST2</i> mRNA nicht mehr spezifisch an der Knospenspitze lokalisiert.....	67
3	Diskussion	70
3.1	Konservierte Funktionen des Transkriptionsfaktors <i>ASH1</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Candida albicans</i>	71
3.2	<i>PCL5</i> , Zielgen des Transkriptionsfaktors Ash1p	74
3.3	Transkriptionsregulation und Funktion des Cyclins <i>PCL5</i>	78
3.4	<i>PCL5</i> , ein Asymmetrie-Erzeuger ?	81
3.5	Ein Modell für die Asymmetrie in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
3.6	Zukünftige Aufgaben	90
4	Material.....	92
4.1	Oligonukleotid-Primer	92
4.1.1	Primer für Gendisruptionen und Verifizierung der Gendisruptionen	92
4.1.2	Primer für Epitop-Fusionen.....	93

4.1.3	Primer für Northernblot-Sonden	93
4.1.4	Primer für die <i>in vitro</i> Transkription	93
4.1.5	Primer für Sequenzierungen.....	94
4.1.6	Primer für Klonierung des <i>PCL5</i> Promotors vor das Luziferase-Gen	94
4.2	Vektoren und Plasmide	94
4.2.1	Vektoren	94
4.2.2	Plasmide	95
4.2.3	Für diese Arbeit erzeugte Plasmide.....	96
4.3	Bakterien- und Hefestämme	96
4.3.1	Bakterienstämme	96
4.3.2	Hefestämme.....	96
4.4	Antikörper	102
4.5	Enzyme.....	102
4.6	Molekularbiologische Baukästen (Kits).....	103
5	Methoden	104
5.1	Bestimmung der Zelldichte	104
5.2	Hefetransformation.....	104
5.3	Deletion eines Gens.....	104
5.4	Prinzip der Selektion mit dem Reporter <i>HO-ADE</i>	105
5.5	Epitop-Markierung	106
5.6	Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen	106
5.7	Western Blot.....	107
5.8	DNA-Präparation aus Hefe	107
5.9	RNA-Präparation aus Hefe (Cross and Tinkelenberg 1991).....	108
5.10	mRNA-Aufreinigung	109
5.11	Herstellung einer ³² P-markierten Sonde.....	109
5.12	Northern Blot.....	110
5.13	Microarray-Analyse	111
5.14	Immunfluoreszenz.....	111

5.14.1	Vorbereitung der Zellen	111
5.14.2	Immunfluoreszenz	112
5.15	Aktinfärbung	112
5.16	Calcofluor-Färbung	113
5.17	In-situ Hybridisierung	113
5.18	Das Luziferase-Reportersystem	113
5.19	Transformation von DNA in Bakterien.....	114
5.19.1	Kompetente Zellen	114
5.19.2	Transformation	115
5.20	Präparation von Plasmid-DNA.....	115
6	Literaturverzeichnis	116
7	Abkürzungsverzeichnis	123
8	Publikationen.....	126
9	Danksagung.....	127
10	Zusammenfassung.....	128
11	Summary	130

1 Einleitung

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Obgleich schon 3000 Jahre vor unserer Zeitrechnung Ägypter und Babylonier in der Lage waren, mit Hilfe von Wildhefen Brot und Bier herzustellen, zog sich die Epoche der geheimnisvollen Gärung noch bis ins 19. Jahrhundert. Der „Zuckerpilz“ *Saccharomyces cerevisiae* der für dieses Wunder verantwortlich ist, ist seit 1825 wissenschaftlich bekannt. Aber nicht nur in alltäglichen Dingen erfreut sich die Bäckerhefe ihrer Popularität, heute ist *Saccharomyces cerevisiae*, einer der wichtigsten Modellorganismen in der Molekularbiologie und Genetik. Nachdem es 1996 einem internationalen Konsortium von Wissenschaftlern erstmals gelang, die gesamte genetische Information eines Eukaryonten (*S.cerevisiae*) zu entschlüsseln, ist es eine Leichtigkeit mit Hilfe der Hefe als Modellsystem zelluläre Prozesse wie Genregulation, Zellzyklus, Zellteilung, Rekombination, Proteinsekretion, Kernimport und Export und Strukturen wie Kernporenkomplex und Zytoskelett zu untersuchen. Die Hefe verfügt als einzelliger niederer Eukaryont über die gleichen zellulären Grundfunktionen wie höhere Eukaryonten. Die kurze Generationszeit und leichte Kultivierung plus eine Vielzahl verfügbarer Techniken zeigen sich als äußerst vorteilhaft für die Arbeit mit *Saccharomyces cerevisiae*. Für genetische Untersuchungen erweist sich die stabile haploide Phase der Laborstämme als günstig. Mit Hilfe verschiedener Expressionssysteme, der Epitop-Markierung von Proteinen, der einfach zu handhabenden Deletion von Genen durch Kassettenmodule sind nicht nur genetische, zellbiologische und biochemische Fragestellungen zu beantworten. Diese Techniken ermöglichen auch die Untersuchung einfacher Differenzierungsprozesse.

1.2 *Saccharomyces cerevisiae* – Der Lebens- und Vegetationszyklus

Saccharomyces cerevisiae wird taxonomisch der Klasse der Ascomycetes zugeordnet. Pilze, die dieser Klasse angehören sind zu einem heterophasischen Generationswechsel befähigt. Im vegetativen Zustand vermehrt sich die Hefezelle asexuell durch Sprossung. Gegen Ende der G1-Phase bildet sich an der sogenannten „Mutterzelle“ ein Auswuchs, die Knospe. Während die Mutterzelle relativ konstant in ihrer Größe bleibt, vergrößert sich die Knospe, bis sie am

Ende der M-Phase annähernd die Größe der Mutterzelle erreicht und sich dann als „Tochterzelle“ abschnürt. Jede Zellteilung hinterlässt in der Zellwand der Mutter eine Bildungsnarbe, während an der Tochterzelle eine Entstehungsnarbe zurückbleibt. Nach 32 Teilungen ist die Hefezelle nicht mehr weiter teilungsfähig (Quelle: Strasburger, Lehrbuch der Botanik, 1998). In der Natur kommt Hefe überwiegend in der diploiden Lebensphase vor. Das Knospungsmuster diploider Zellen unterscheidet sich von dem haploider Zellen. Typischerweise knospen diploide Hefezellen im bipolaren Muster. Die Tochter knospt für gewöhnlich am distalen Pol der Entstehungsnarbe, während die Mutter an beiden Polen knospen kann. Hingegen knospen haploide Zellen nach einem sogenannten axialen Muster, sprich beide, Mutter und Tochter, werden in der Nähe der Pole der vorangegangenen Zellteilung knospen.

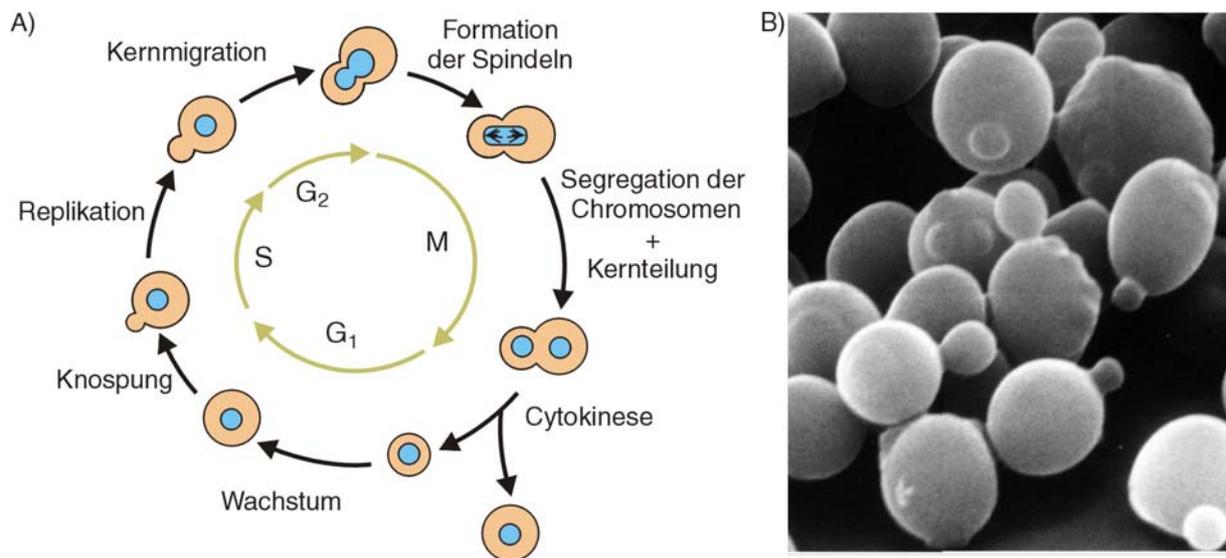


Abb. 1-1 A) Der Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* (Quelle: Lodish et al., 1999). Im Gegensatz zu den meisten Eukaryonten vermehrt sich Bierhefe auf relativ ungewöhnliche Weise, indem die Mutterzelle gegen Ende der G₁-Phase eine Knospe ausbildet. Die Knospe wächst im Laufe des Zellzyklus nahezu zu der Größe der Mutterzelle heran und trennt sich dann von ihr. Während der Mitose bleibt die Kernhülle intakt. Weil die Tochterzelle kleiner als die Mutterzelle ist, durchläuft sie wachstumsbedingt eine längere G₁-Phase, bis sie die entsprechende Größe erreicht, um eine Knospe zu bilden und in die S-Phase einzutreten. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hefezellen. Die Aufnahme zeigt Zellen in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus. Je größer die Knospe, desto weiter ist die Zelle im Zellzyklus vorangeschritten.

Nahrungsmangel löst die Sporulation diploider Zellen aus. Hierbei durchläuft die Zelle eine Meiose. Es entsteht eine Tetrade, die aus 4 haploiden Ascosporen besteht, je zwei vom Paarungstyp a und zwei vom Paarungstyp α . Nachdem der Ascus aufgebrochen ist, werden die haploiden Sporen freigesetzt. Sofern ausreichend Nahrung vorhanden ist, bilden die

Sporen haploide Zellen, die sich dann vegetativ durch Knospung vermehren oder geschlechtlich miteinander konjugieren. Jede der beiden haploiden Zellen sezerniert ein spezifisches Pheromon, das an einen an der Zelloberfläche befindlichen Rezeptor des entgegengesetzten Paarungstyps bindet. Die Bindung löst eine Signalkaskade aus, die zur Fusion der beiden Zellen führt. Die diploide Zygote (a/α) ist dann in der Lage sich vegetativ durch Sprossung zu vermehren.

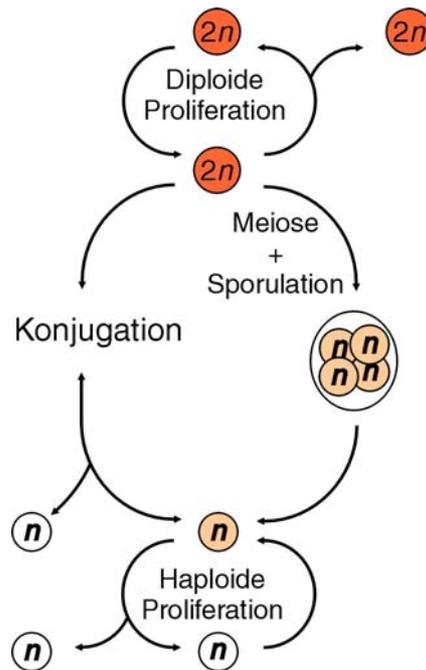


Abb. 1-2 Lebenszyklus von *Saccharomyces cerevisiae*. Im diploiden Zustand vermehrt sich *S. cerevisiae* vegetativ. Ein Hungern der Zellen löst die Sporulation aus, sie durchlaufen eine Meiose und bilden Sporen. Die Sporen, je zwei vom Paarungstyp a und zwei vom Paarungstyp α , werden von einer Hülle, dem Ascus umgeben. Sobald sich die Wachstumsbedingungen verbessern, keimen die Sporen aus. Die haploiden Zellen können sich entweder vegetativ vermehren oder durch Konjugation zweier Zellen unterschiedlichen Paarungstyps zur diploiden Vegetationsphase zurückkehren.

1.3 Der Paarungstypwechsel

Grundlegende Eigenschaften, die für einen bestimmten Zelltyp charakteristisch sind, werden durch ein bestimmtes Muster an exprimierten Genen innerhalb von Zellen festgelegt. Die verschiedenen Zelltypen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die Paarungstypen a und α sowie der Vorgang des Paarungstypwechsels sind einfache Beispiele für die basale Differenzierung, die Lebewesen zu dem machen, was sie sind.

Nach Abknospung der Tochterzelle kann eine haploide Wildtyp-Hefezelle ihren Paarungstyp wechseln und ist dann in der Lage, sich mit Hefezellen des gegensätzlichen Paarungstyps zu paaren. Verursacht wird dies durch die asymmetrische Aktivierung der am Vorgang des Paarungstypwechsels beteiligten *HO*-Endonuklease. Am Paarungstypwechsel sind drei genetische Loci auf dem Hefechromosom III direkt beteiligt. Diese sind zum einen der exprimierte „*Mating Type*“ (*MAT*)-Locus und zum anderen die zwei stillen Loci *HML* und *HMR* (homothallische mating-type-Kopie links bzw. rechts). Es gibt zwei verschiedene Allele *a* und α . Haploide Zellen besitzen jeweils nur ein Paarungstyp-Allel (*a* oder α), wohingegen die diploide Zygote beide besitzt (*a/a*).

Die „mating-type“-Gene codieren für Proteine, die den Zellen Eigenschaften entweder des *a*- oder α -Phänotypen verleihen. Zudem werden in beiden Zelltypen noch haploid-spezifische Gene exprimiert (Haber 1998). Der *Mat*-Locus ist außerdem in diploiden Zellen für die Regulation von sporulationsspezifischen Genen verantwortlich. Die vom *MAT*-Locus in α -Zellen exprimierten Gene $\alpha 1p$ und $\alpha 2p$ regulieren gemeinsam mit dem allgemeinen Transkriptionsfaktor *Mcm1p* eine Reihe von α -spezifischen Genen (Shore and Sharrocks 1995). Das Heterodimer $\alpha 1p/Mcm1p$ aktiviert α -spezifische Gene, während $\alpha 2p$ zusammen mit *Mcm1p* als Transkriptionsrepressor *a*-spezifischer Gene fungiert (Wolberger 1998). In Zellen des Paarungstyps *a* fehlen die beiden Faktoren $\alpha 1p$ und $\alpha 2p$, weshalb es nicht zur Expression α -spezifischer Gene kommt. Ohne seinen Partner $\alpha 2p$ aktiviert *Mcm1p* in diesem Fall *a*-spezifische Gene (Goutte and Johnson 1988). Für den Transkriptionsfaktor $\alpha 1p$ konnte bislang nur eine Funktion in diploiden Zellen nachgewiesen werden. Gemeinsam mit $\alpha 2p$ inaktiviert er haploid-spezifische Gene (Li, Stark et al. 1995; Li, Jin et al. 1998).

Eine normale haploide Hefezelle wechselt in jeder Generation ihren Paarungstyp. Während des Paarungstypwechsels wird die DNA des aktiven *MAT*-Locus ersetzt. Der Sequenzwechsel erfolgt über direkte Genkonversion. Dabei werden beide DNA-Stränge am *MAT*-Locus sequenzspezifisch von der *HO*-Endonuclease geschnitten. Die Schnittenden paaren dann mit der DNA von *HMR* oder *HML* mit der entgegengesetzten Paarungstypinformation. Es handelt sich hierbei um stille Kopien des *MAT*-Locus, die durch die Proteine *Sir1p-Sir4p* (Silent information regulator) reprimiert werden und aus inaktivem, hypoacetylierten Heterochromatin bestehen.

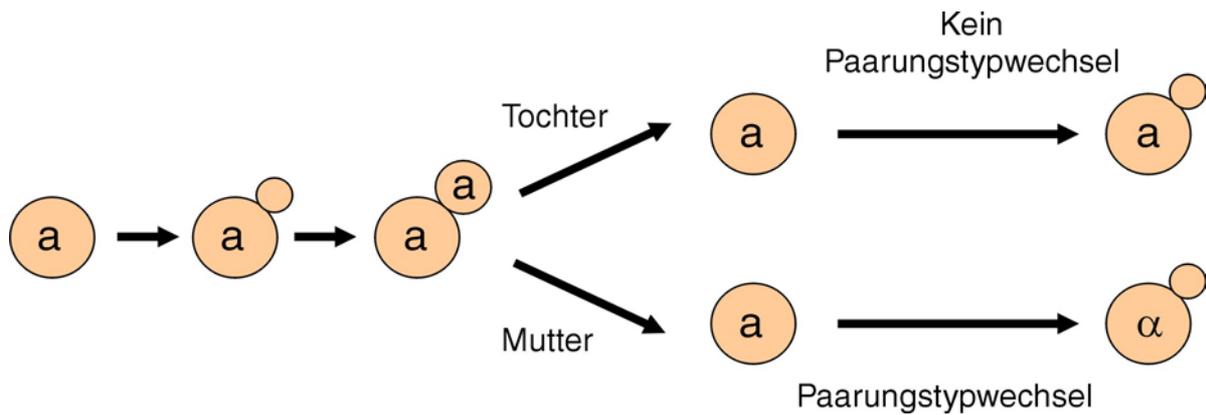


Abb. 1-3 Der Paarungstypwechsel haploider Hefezellen. Nach Abknospung der Tochterzelle kann die Mutterzelle ihren Paarungstyp während der folgenden Zellzyklusrunde wechseln, die Tochterzelle jedoch nicht.

Aufgrund einer Punktmutation im *HO*-Gen fehlt Laborstämmen die Fähigkeit zum Paarungstypwechsel. Sie werden als heterothallisch bezeichnet. Ein nicht funktionelles *HO*-Allel führt zu der erwünschten stabilen haploiden Lebensphase, die genetische Manipulationen vereinfacht.

1.4 Die Kontrolle der *HO*-Expression

Die Fähigkeit, den Paarungstyp zu wechseln, besitzt die haploide Mutterzelle nur zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus (späte G₁-Phase). Aus der folgenden Zellteilung gehen zwei Hefezellen unterschiedlichen Paarungstyps hervor (Nasmyth 1993). Durch die Transkriptionsregulation des *HO*-Locus wird diese Asymmetrie des Paarungstyps erst ermöglicht. Die regulierte Expression der *HO*-Endonuclease verlangt eine ausgeklügelte Bindungs-Choreographie verschiedener Transkriptionsfaktoren mit unterschiedlichen Rollen. Die Aktivierung erfolgt schrittweise durch die zeitliche Rekrutierung und Aktivität von Swi5p, SWI/SNF, SAGA und SBF (Cosma, Tanaka et al. 1999; Krebs, Kuo et al. 1999).

Das Zinkfingerprotein Swi5p aktiviert in Kooperation mit dem Homeodomänenprotein Pho2p die Transkription von *HO* (Bhoite, Allen et al. 2002). Swi5p wird während der S-Phase des Zellzyklus exprimiert und bleibt im Zytoplasma bis Ende der Anaphase (Nasmyth, Seddon et al. 1987; Moll, Tebb et al. 1991; Nasmyth 1993). Zu diesem Zeitpunkt gelangt es nach Inaktivierung durch eine Clbp/Cdc28p Kinase in den Zellkern (Visintin and Amon 2000). Hier kann Swi5p an DNA binden und somit die Expression verschiedenster Gene regulieren.

Durch Swi5p regulierte Gene sind zum Beispiel die beiden Cycline *PCL2* und *PCL9*, der DNA-Replikations-Initiator *CDC6* und *HO* (Doolin, Johnson et al. 2001). Im Falle des *HO*-Gens bindet Swi5p innerhalb einer ca. 1,5 Kb großen Promotorregion, die neben einer TATA-Box auch zwei „Upstream Regulatory Sequences“ (URS1 und URS2) enthält, an die URS1. Die URS1-Region reguliert die Mutterzellen-Spezifität, während URS2 die Zellzyklus-Regulation von *HO* kontrolliert. Die Bindung von Swi5p an zwei Stellen in der URS1 löst die Rekrutierung des Chromatin-Remodelierungs-Komplexes SWI/SNF an URS1 und URS2 aus. Anschließend kommt es zur Degradation des instabilen Proteins Swi5p. Mit Verschwinden von Swi5p bindet der SAGA-Histonacetyltransferase-Komplex an den Promotor. Das ATP-abhängige Remodelieren der Nucleosomen am *HO*-Promotor durch SWI/SNF und SAGA erlaubt es dem zellzyklusabhängig regulierten Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktor SBF an die URS2-Region zu binden. SBF wiederum rekrutiert den Mediator-Komplex an URS2 und die TATA-Box. Der Mediator-Komplex befindet sich allerdings schon vorher an der URS1, möglicherweise um schnell vor Ort zu sein (Bhoite, Yu et al. 2001; Cosma, Panizza et al. 2001). Schließlich führt die Reaktivierung der Cdk1 Protein Kinase in Spät-G₁ zur Rekrutierung der RNA-Polymerase II (PolII) und den allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIID (Cosma, Panizza et al. 2001; Cosma 2002). Damit kommt es zur Transkriptions-Initiation der *HO*-Endonuclease. Die RNA-Polymerase wird nicht wie lange postuliert als Holoenzym rekrutiert, sondern in zwei Schritten, dem Cdk1-unabhängigen Erscheinen des Mediator-Komplexes und dem folgenden Cdk1-abhängigen Rekrutieren von PolII, TFIIB und TFIID (Cosma 2002).

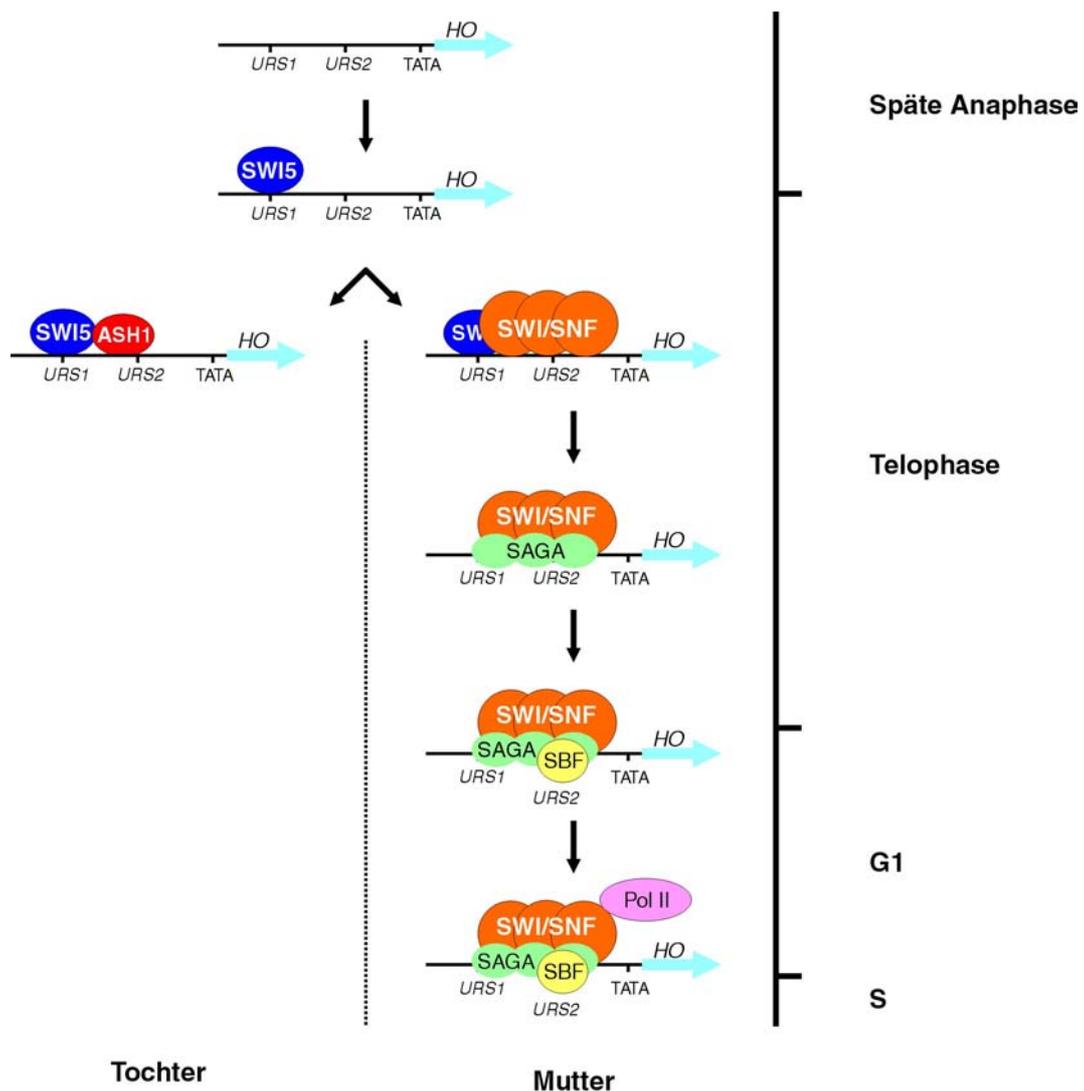


Abb. 1-4 Die transkriptionelle Regulation des *HO*-Gens von der späten Mitose bis zur späten G1-Phase des Zellzyklus (Cosma 2002). Nach Inaktivierung von Cdk1 in der späten Anaphase gelangt Swi5p in den Zellkern sowohl der Tochter- als auch der Mutterzelle. Dort assoziiert Swi5p mit der *URS1* Region des *HO*-Promotors. Die Bindung von Ash1p an die *URS1* verhindert die Rekrutierung des SWI/SNF Komplex und somit die Transkription von *HO*. In der Mutterzelle induziert Swi5p die Rekrutierung des SWI/SNF Komplex, was die Assoziation von SAGA mit dem *HO*-Promotor zur Folge hat. Histon-Acetylierung und Nucleosomen-Remodelierungen unterstützen die Bindung von SBF an die *URS2*-Region. Der Mediator (Med) assoziiert zunächst mit der *URS1* und nach der Bindung von SBF mit *URS2* und der TATA-Box. Die Reaktivierung von Cdk1 in der späten G1-Phase führt zur Rekrutierung von PolII, TFIIB und TFIID und schließlich zur Transkription des *HO*-Gens.

Ein hoher Level an Histon Acetylierung korreliert mit aktiven Chromatin-Regionen, während mit einigen Ausnahmen in transkriptionell inaktiven Regionen kaum Acetylierungen vorzufinden sind (Krebs, Kuo et al. 1999). So hält der Sin3p/Rpd3p-Komplex das *HO*-Gen durch Deacetylierung des Chromatins inaktiv (Fazio, Kooperberg et al. 2001).

Die bisher beschriebenen Transkriptionsfaktoren werden zwar teilweise zellzyklusabhängig aktiv, aber alle sind sowohl in Mutter- als auch in Tochterzellen gleichmäßig häufig vertreten.

Wie kommt es aber zur asymmetrischen Expression der für den Paarungstypwechsel verantwortlichen *HO*-Endonuclease?

Bei der Suche nach Mutanten mit einem Defekt in der Repression von *HO* in den Tochterzellen fand man, daß Mutationen im *ASH1*-Gen (Asymmetric Synthesis of HO) die Zahl der Tochterzellen, die die Fähigkeit besitzen, den Paarungstyp zu wechseln, von 0% auf 82% erhöht (Bobola, Jansen et al. 1996). *ASH1* codiert für ein 66kDa Zinkfinger-Protein. Ash1p ist verwandt mit der Familie der GATA-Faktoren, die sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren fungieren können. Ash1p akkumuliert spezifisch im Tochter-Zellkern am Ende der Anaphase (Bobola, Jansen et al. 1996; Sil and Herskowitz 1996). Hier bindet Ash1p direkt an die Konsensussequenz YTGAT innerhalb der URS1 des *HO*-Promotors (Maxon and Herskowitz 2001). Die Reprimierung der *HO*-Endonuclease erfolgt möglicherweise unabhängig von Swi5p und unabhängig von gewöhnlichen Transkriptionsrepressoren wie der Histon-Deacetylase *RPD3*. Ash1p hemmt nicht die *HO*-Erkennung und Bindung von Swi5p. Vielmehr verhindert gebundenes Ash1p die Rekrutierung von SWI/SNF. Dadurch wird eine für die Transkription notwendige Chromatin Remodelierung am *HO*-Promotor unterbunden. Das hat zur Folge, daß die sich abschnürende Tochterzelle in der nächsten Zellzyklusrunde den Paarungstyp nicht wechseln kann (Maxon and Herskowitz 2001).

1.5 Das asymmetrische Verteilungsmuster von Ash1p

1996 identifizierten Jansen *et al.* 5 Gene, die für die mutterspezifische Expression von *HO* benötigt werden: *SHE1-SHE5* (Swi5p-dependent HO Expression). Es stellte sich bald heraus, daß die *SHE*-Gene weder einen Einfluß auf die Expression noch die Regulation von Swi5p haben. Stattdessen wird die asymmetrische Expression der *HO*-Endonuclease in der Mutterzelle über die asymmetrische Verteilung des *HO*-Transkriptionsrepressors Ash1p gesteuert (Jansen, Dowzer et al. 1996). Diese asymmetrische Verteilung von Ash1p ist abhängig von den 5 *SHE*-Genen. Mutationen in diesen Genen haben zur Folge, daß Ash1p nicht nur, wie in Wildtypzellen vorwiegend im Tochterzellkern vorzufinden ist, sondern in beiden Zellkernen, also auch im Mutterzellkern. Daraus resultiert eine Reprimierung der *HO*-Endonuclease in der Mutter und diese kann den Paarungstyp nicht mehr wechseln.

Ash1 Protein ist am Ende der Anaphase selektiv im Tochterzellkern angereichert. Für diese asymmetrische Verteilung ist die Aktivität der *SHE*-Gene notwendig (Bobola, Jansen et al. 1996; Sil and Herskowitz 1996). Die She-Proteine selbst zeigen ebenfalls zum Teil eine

asymmetrische Lokalisation. Sie lokalisieren mit Ausnahme von She5p in der Spitze der Knospe. She5p (Bni1p) lokalisiert nur zu Beginn des Knospungsvorgangs in der Spitze der Knospe und anschließend in der Anaphase dann an der Verbindungsstelle zwischen Mutter- und Tochterzelle. Ash1 Protein wird nur zu einem späten Zeitpunkt des Zellzyklus im Tochterzellkern detektiert, zu einer Zeit, in der die She-Proteine nicht mehr lokalisiert sind (Chang and Drubin 1996). Ein direkter Transport des Ash1 Proteins ist dadurch unwahrscheinlich. Die Generierung der asymmetrischen Proteinverteilung wird hier durch den Mechanismus der mRNA Lokalisation verursacht (Long, Singer et al. 1997).

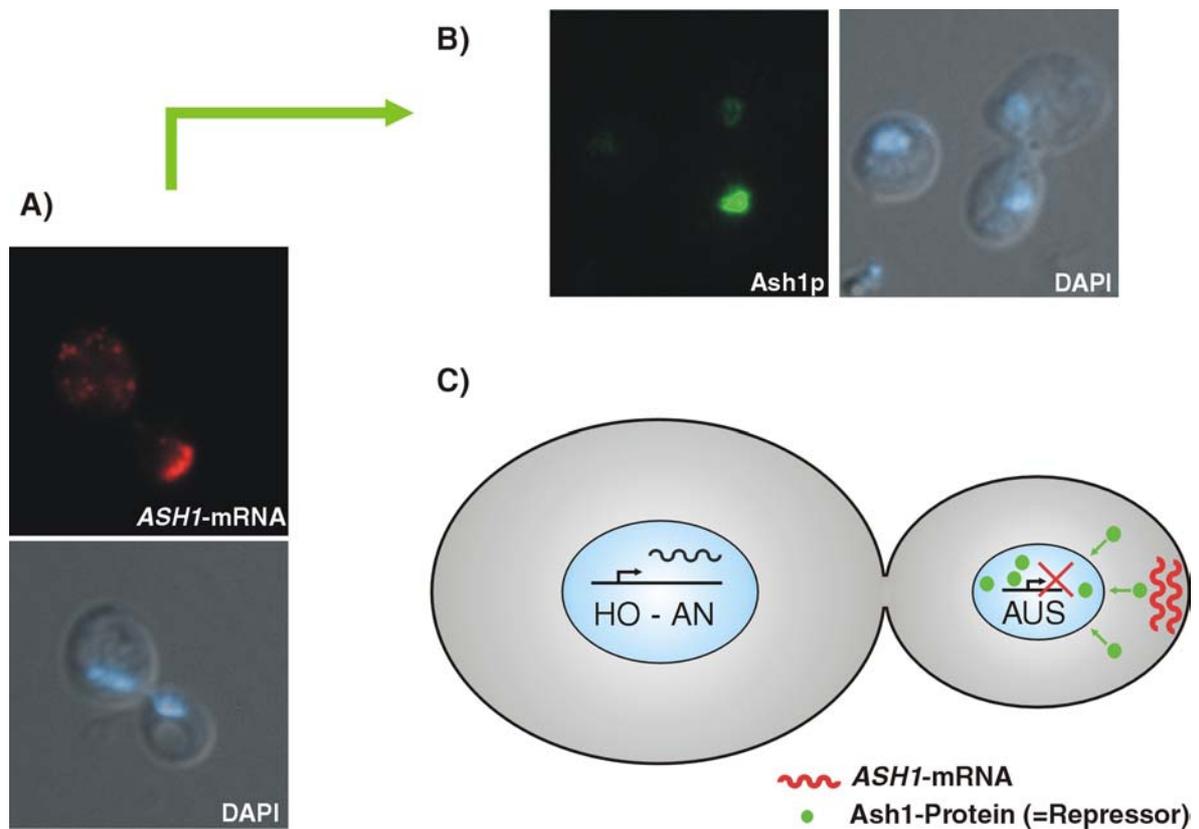


Abb. 1-5 Ash1p ist ein asymmetrisch verteilter Transkriptionsrepressor der *HO*-Endonuclease. A) Die *ASH1*-Expression wird in der späten Anaphase durch den Transkriptionsfaktor Swi5p aktiviert. Die *ASH1* mRNA wird an die Knospenspitze der Tochterzelle transportiert. B) Ash1-Protein akkumuliert im Wildtyp im Zellkern der Tochterzelle. C) Schematische Darstellung: Dadurch, daß *ASH1* mRNA (rot) an die Knospenspitze lokalisiert, akkumuliert Ash1-Protein (grün) anschließend im Tochterzellkern und reprimiert dort die Expression der *HO*-Endonuclease (AUS). Die Tochter kann folglich ihren Paarungstyp nicht wechseln. In der Mutterzelle wird die *HO*-Endonuclease exprimiert (HO-AN), so daß diese ihren Paarungstyp wechselt.

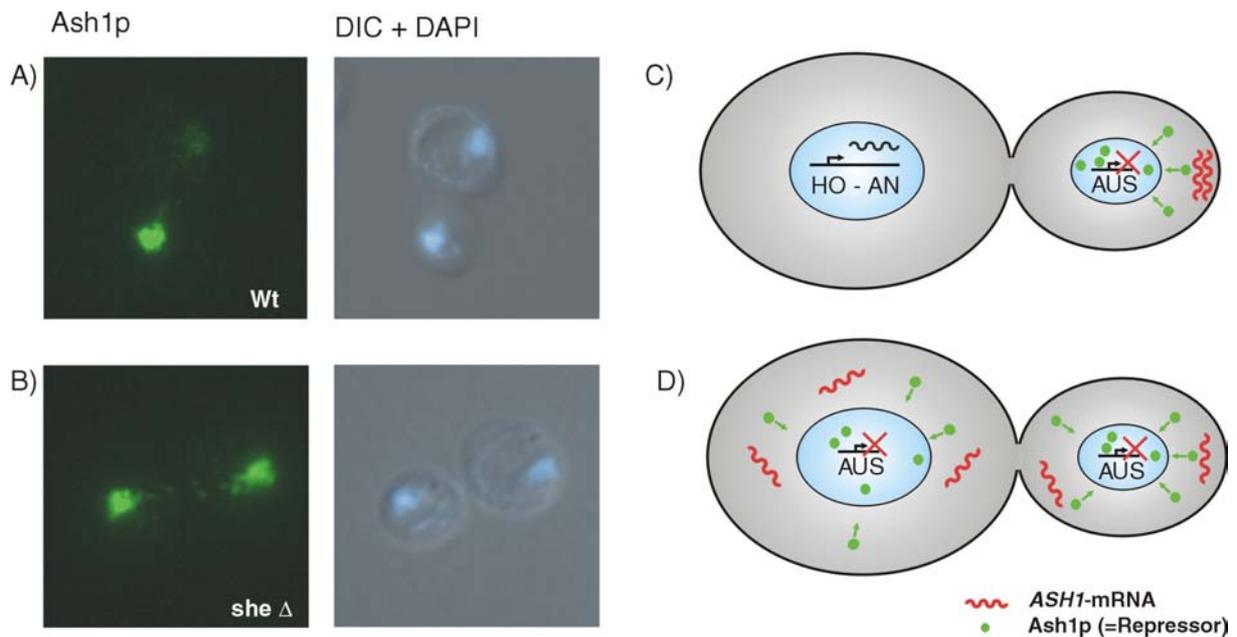


Abb. 1-6 Die Verteilung des Ash1 Proteins in *she*-Mutanten. Im Gegensatz zum Wildtyp (A) wird Ash1p in den *she*-Mutanten nicht nur im Tochterzellkern angereichert, sondern auch im Zellkern der Mutterzelle (B). Aufgrund der fehlenden Lokalisation der *ASH1* mRNA in *she*-Mutanten akkumuliert Ash1p in Mutter- und Tochterzelle und reprimiert in beiden die Transkription der *HO*-Endonuclease (C: Wildtyp; D: *she* Δ).

Die Etablierung einer solchen Polarität mittels mRNA Lokalisation kann über mindestens drei Wege geschehen. Entweder über einen direkten Transport der mRNA (a), die Stabilization der mRNA vor Ort (b) oder einem Abfangen am Bestimmungsort (c). Wird die mRNA vor Ort stabilisiert, heißt das, daß sie an allen anderen Orten, an denen sie sich befindet, spezifisch degradiert werden muß. Der direkte Transport verlangt ein Verpacken der mRNA in Ribonucleoprotein Partikel (RNP), die abhängig von Motorproteinen und Zytoskelett transportiert werden und am Bestimmungsort verankert werden (Lipshitz and Smibert 2000; Chartrand, Singer et al. 2001; Jansen 2001).

In den letzten Jahren konnte ein nahezu komplettes Modell zur *ASH1* mRNA Lokalisation erstellt werden (Kwon and Schnapp 2001). Es handelt sich hierbei um einen Aktin-abhängigen Transport von RNP's. Neben den She-Proteinen werden noch mindestens drei andere Proteine für die korrekte Positionierung der *ASH1* mRNA benötigt.

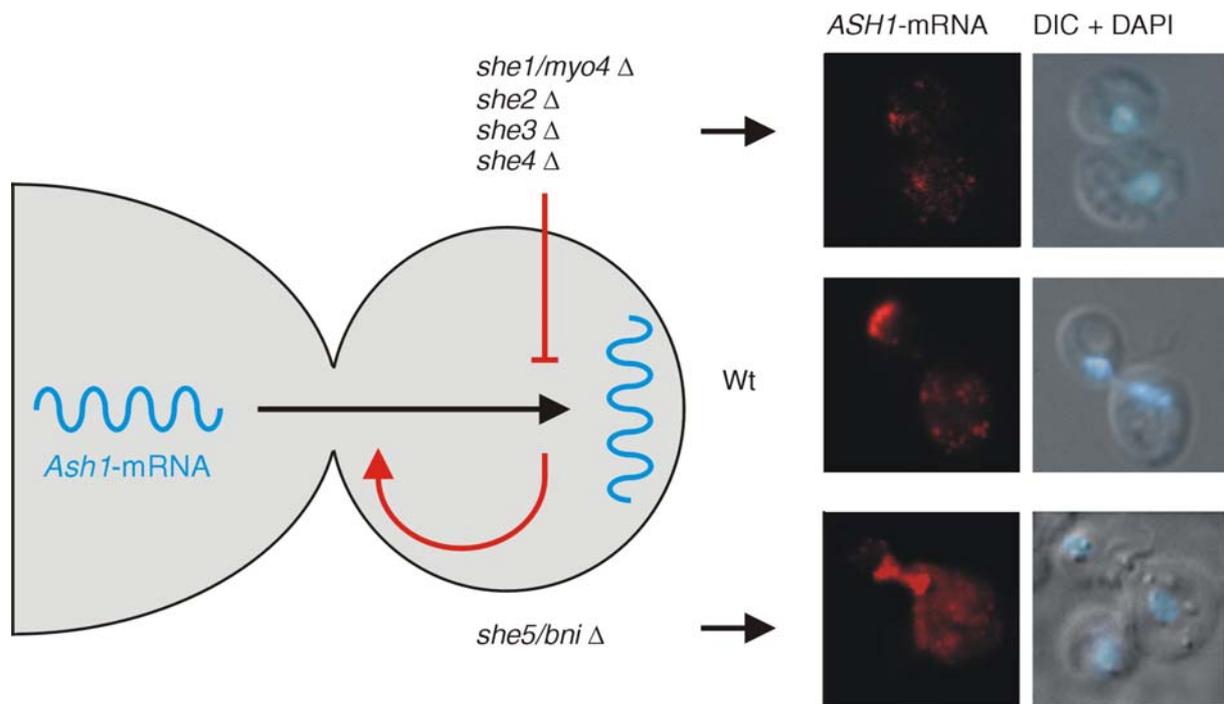


Abb. 1-7 Der Einfluss von *she*-Mutationen auf die Lokalisation der *ASH1* mRNA. Im Wildtyp (Wt) lokalisiert die *ASH1* mRNA an die Knospenspitze. Werden die Gene *SHE1*, *SHE2*, *SHE3* oder *SHE4* deletiert, lokalisiert die *ASH1* mRNA nicht mehr. In einem *she5* Deletionsstamm mislokalisiert die *ASH1* mRNA an die Verbindungsstelle zwischen Mutterzelle und Knospe.

Die Ortsbestimmung der lokalisierten mRNAs in verschiedenen Spezies wird über cis-agierende RNA-Elemente, an die RNA-bindende Proteine binden, gesteuert. Diese Elemente liegen meistens in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der mRNA (Bashirullah, Cooperstock et al. 1998; Jansen 2001). Ausnahmen dieser Regel sind z.B. *gurken*-mRNA in der Drosophila-Oozyte und *ASH1* mRNA. Die *gurken*-mRNA besitzt Lokalisationselemente sowohl in der 3'UTR als auch in der 5'UTR. Zusätzlich befindet sich auch ein Lokalisationsignal in der codierenden Sequenz (Saunders and Cohen 1999; Thio, Ray et al. 2000). Die *ASH1* mRNA besitzt 4 Lokalisationselemente. E1, E2A und E2B liegen innerhalb des Ash1p codierenden Bereichs. E3 zieht sich über einen Bereich der kurz vor dem Stopcodon beginnt, aber überwiegend in der 3'UTR liegt (Chartrand, Meng et al. 1999; Gonzalez, Buonomo et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei She2p um das RNA-bindende Protein handelt. She2p bindet spezifisch an die 4 Lokalisationselemente im *ASH1*-Transkript (Bohl, Kruse et al. 2000; Long, Gu et al. 2000; Takizawa and Vale 2000). 2001 wurde ein weiteres, nukleäres, Protein entdeckt, welches in der Lokalisation der *ASH1* mRNA involviert ist. Es handelt sich hierbei um Loc1p (Localization of mRNA). In *loc1* Mutanten wird zwar die *ASH1* mRNA aus

dem Zellkern exportiert, allerdings nicht mehr lokalisiert. Es wird angenommen, daß Loc1p entweder die mRNA Faltung erleichtert oder She2p assistiert und die Aggregation eines RNP-Partikels initiiert (Long, Gu et al. 2001). Abhängig von Mex67p wird der She2p-RNP-Komplex über Kernporen ins Zytoplasma exportiert (Hurt, Strasser et al. 2000; Kruse, Jaedicke et al. 2002). Die Rolle des 47kDa großen She3p definiert den zweiten Schritt des Lokalisationsweges. She3p hat Eigenschaften eines Adapters. Der Carboxy-Terminus interagiert mit She2p, während der aminoterminaler Teil, der vermutlich eine coiled-coil-Domäne ausbildet, mit She1p/Myo4p interagiert (Bohl, Kruse et al. 2000). *SHE1/MYO4* codiert für ein Myosin der Myosin-Klasse V. Es hat ein Molekulargewicht von 169 kDa und zeigt 73% Homologie in seiner Motordomäne zu Myo2p, dem zweiten Klasse V Myosin in *Saccharomyces cerevisiae* (Titus 1997). Myo2p beteiligt sich am Vesikeltransport. Da beide Myosine nur 27% identisch sind im globulären Schwanzbereich kann man davon ausgehen, daß Myo4p und Myo2p unterschiedliche Funktionen besitzen, sofern die Schwanzdomäne die Spezifität determiniert (Johnston, Prendergast et al. 1991; Govindan, Bowser et al. 1995; Reck-Peterson, Provance et al. 2000). In beiden Fällen handelt es sich um Aktin-abhängige, nicht prozessive Motoren (Reck-Peterson, Tyska et al. 2001).

Myo4p und She3p liegen als Prätransportkomplex im Zytoplasma vor, der dann mit She2p als Adaptor an den She2p-RNP-Komplex bindet und die *ASH1* mRNA über Aktinkabel an die Knospenspitze transportiert (Bertrand, Chartrand et al. 1998; Munchow, Sauter et al. 1999; Bohl, Kruse et al. 2000).

In der Knospungsphase organisiert sich das Aktinzytoskelett der Hefe in zwei polarisierte Strukturen, den kortikalen Aktin-„patches“ und den Aktinkabeln (Pruyne and Bretscher 2000). In *she4* Mutanten sind diese Filament-Strukturen zwar noch vorhanden, jedoch ist die Aktinpolarisation gestört. She4p ist Mitglied einer neuen Familie von Proteinen, die eine UCS-Domäne (UNC-45/CRO1/She4p) besitzen. Das *SHE4*-Homolog in *Caenorhabditis elegans*, *UNC-45* wird für die Assemblierung von Myosin-Filamenten benötigt. Barral *et al.* konnten für UNC-45 eine eigene Chaperon- und Hsp90 Co-Chaperon-Funktion für Muskel-Myosin nachweisen (Barral, Bauer et al. 1998; Barral, Hutagalung et al. 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß She4p notwendig für Funktion und Lokalisation verschiedener Myosine der Klasse I und V ist (Toi, Fujimura-Kamada et al. 2003; Wesche, Arnold et al. 2003). Die Frage ob She4p eine Chaperon-Funktion besitzt, ist bislang ungeklärt. Indem eine *she4* Mutation zu nicht funktionellem Myo4p führt, kann man She4p nur eine indirekte Rolle im *ASH1* mRNA Transport zuweisen.

SHE5 ist mit *BNI1* identisch und codiert für das 220kDa große Protein Bni1p, welches zur Familie der Formine gehört. Formine spielen eine Rolle in der Cytokinese und Polarisierung des Zytoskeletts. Sie besitzen typischerweise N-terminale Rho-Binde-Domänen, zentrale Prolin-reiche Formin-Homologie (FH) 1 Domänen und C-terminale FH2 Domänen. FH1-Domänen binden Profilin. FH2-Domänen bleiben am Ende des polarisierten Filaments gebunden und spielen so möglicherweise eine Rolle in der Verankerung der Aktinkabel am Zellkortex. Bni1p interagiert mit der Rho-GTPase Cdc42p und Aktin und stellt somit vermutlich eine Verbindung zwischen dem Cdc42p-Signaltransduktionsweg und der Polarisierung des Aktinzytoskeletts dar (Evangelista, Blundell et al. 1997; Tanaka and Takai 1998; Dong, Pruyne et al. 2003). In einer *bni1* Mutante mislokalisiert die *ASH1* mRNA an der Verbindungsstelle zwischen Mutter- und Tochterzelle. In lebenden Zellen ist allerdings zu beobachten, daß die mRNA in einem *bni1Δ* Stamm zwar in die Tochterzelle transportiert werden kann, aber dort nicht gehalten wird und vor der Zellteilung zurück zur Verbindungsstelle kehrt (Beach, Salmon et al. 1999; Beach and Bloom 2001). Ähnlich verhält es sich in *bud6/aip3* Mutanten. Bud6p spielt neben seiner Rolle im Knospungsmuster diploider Zellen, ebenfalls eine Rolle in der Aktinpolarisation (Beach, Salmon et al. 1999; Beach and Bloom 2001). Obwohl das Aktinzytoskelett in beiden Fällen Störungen aufweist, reicht der Effekt jedoch nicht aus, um den gerichteten Transport zu unterbrechen. Die Verankerung der *ASH1* mRNA an der Knospenspitze ist vermindert, wenn nicht komplett abwesend.

Auch die Translation der *ASH1* mRNA ist für die Verankerung notwendig. Translationsabhängige Lokalisation von mRNAs ist keine Seltenheit. 1995 konnte gezeigt werden, daß für die Lokalisation und Verankerung von *oskar* mRNA in Drosophila Oozyten die Translation erforderlich ist (Rongo, Gavis et al. 1995). Gonzalez *et al.* zeigte, daß durch das Einfügen vorzeitiger Stopkodons in den C-Terminus der Ash1p codierenden Sequenz, eine feste Verankerung der mRNA an die kortikale Spitze verhindert werden kann (Gonzalez, Buonomo et al. 1999). Passend dazu lokalisiert *ASH1* mRNA in *scp160* Mutanten nicht mehr (nicht publizierte Daten von D.Ferring). Scp160p ist ein Polysomen-assoziiertes, RNA-bindendes Protein.

Die Überexpression eines neuen RNA-bindenden Proteins, Khd1p (KH-Domänen Protein1) inhibiert die Translation der *ASH1* mRNA und führt ebenfalls zu einer Delokalisation der mRNA. Khd1p bindet direkt an das E1-Lokalisationselement der *ASH1* mRNA (Irie, Tadauchi et al. 2002). Da angenommen wird, daß die *ASH1* mRNA am distalen Ende der Knospe translatiert wird und dann in den proximalen Tochterzellkern transportiert wird,

könnte die Aufgabe von Khd1p darin bestehen, die Translation während des Transports der mRNA zu inhibieren.

Die Transportmaschinerie, die für die asymmetrische Lokalisation der *ASH1* mRNA verantwortlich ist, transportiert noch eine weitere mRNA an die Knospenspitze der Tochterzelle. Es handelt sich hierbei um die mRNA des putativen Ionenkanals Ist2 (Increased Sodium Tolerance). Auch in diesem Fall ist die asymmetrische Lokalisation der mRNA für die folgende Proteinsynthese verantwortlich. Sequenzanalysen zur Folge besitzt *IST2* mehrere Transmembrandomänen. Demgemäß findet man Ist2 Protein an der Plasmamembran der Tochterknospen angereichert. Aus welchem Grund eine asymmetrische Verteilung eines möglichen Ionenkanals erforderlich ist, ist bislang nicht bekannt (Takizawa, DeRisi et al. 2000; Chartrand, Singer et al. 2001).

1.6 Die Rolle der Cyclin-abhängigen Kinase *PHO85* im asymmetrischen Verteilungsmuster von Ash1p

Ash1p verhindert, dass die Tochterzelle ihren Paarungstyp wechselt, aber auch sie wird im nächsten Zellzyklus Mutter und benötigt die Fähigkeit, den Paarungstyp zu wechseln. Ash1p muß also spätestens nach der G1 Phase zerstört werden. Wie die Degradation des Ash1 Proteins reguliert wird, ist nicht bekannt. Erste Erkenntnisse hierzu konnten von McBride und Kollegen erbracht werden. In einem *pho85Δ* Stamm ist Ash1p nicht nur im Mutterzellkern mislokalisiert, sondern auch stabilisiert (McBride, Sil et al. 2001).

Pho85p ist eine nicht essentielle Cyclin-abhängige Kinase (CDK), die je nach Assoziation mit einem ihrer zehn verschiedenen Cycline in vielen verschiedenen Signaltransduktionswegen involviert ist (Measday, Moore et al. 1997). Die meisten Assoziationen beziehen sich auf Veränderungen in der extrazellulären Umgebung. Es scheint als würde die Kinase-Aktivität des jeweiligen Pho85-Komplexes der Zelle signalisieren, daß die augenblickliche Umgebungssituation hinreichend ist. Wenn z.B. der Zelle genügend Phosphat zur Verfügung steht, ist der für den Phosphat Metabolismus zuständige Komplex (Pho85p-Pho80p) aktiv. Sobald der anorganische Phosphatlevel fällt, wird Pho85p-Pho80p inaktiv und über einen Signaltransduktionsweg wird die Expression der Gene gesteuert, welche ein Überleben der Zelle bei Phosphatmangel sichern (Hirst, Fisher et al. 1994; Kaffman, Herskowitz et al. 1994; Schneider, Smith et al. 1994).

Die Vielfalt der Transduktionswege, in die Pho85p involviert ist, wird durch die Anzahl der Cycline, mit der die CDK interagiert, gewährleistet. Die so genannten Pcls (Pho85 Cyclins) sind durch ihre Sequenzhomologien in zwei Unterfamilien aufgeteilt: die Pcl1,2 Unterfamilie, der Pcl1, Pcl2, Clg1, Pcl5 und Pcl9 angehören und die Pho80 Unterfamilie zu der Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 und Pcl10 gezählt wird (Measday, Moore et al. 1997; Measday, McBride et al. 2000).

Für die Cycline Pcl1p, Pcl2p und Pcl9p, die eine starke Zellzyklus-regulierte Expression zeigen, werden Rollen im Fortlauf des Zellzyklus vorhergesagt. So konnte gezeigt werden, daß Pcl1p und Pcl2p im Komplex mit Pho85p in der Abwesenheit von Cln1,2-Cdc28 notwendig sind, um den Zellzyklus-Kontrollpunkt START zu passieren. Pcl6p, Pcl7p, Pcl8p und Pcl10p werden mit dem Glycogen Metabolismus in Verbindung gebracht (Carroll and O'Shea 2002). Für Pcl5p-Pho85p konnte bisher eine Rolle in der Degradation des Transkriptionsfaktors Gcn4p nachgewiesen werden. Gcn4p ist verantwortlich für das Überleben der Hefezellen, wenn nicht ausreichend Aminosäuren und Purine zur Verfügung stehen. Mindestens 35 Gene, die für Enzyme der Aminosäure-Biosynthese codieren, werden transkriptionell durch Gcn4p induziert. Darunter befinden sich auch Aminosäure tRNA Synthetasen, denen eine sensorische Funktion zugeordnet wird. Dieses komplexe genetische System wird als „Allgemeine Kontrolle der Aminosäure Biosynthese“ bezeichnet (Albrecht, Mosch et al. 1998; Natarajan, Meyer et al. 2001). Pcl5p induziert durch Phosphorylierung die Degradation von Gcn4p. Gcn4p wiederum bewirkt die Transkription von Pcl5p und ist somit indirekt für seinen eigenen Abbau verantwortlich. Pcl5p ist also wie viele Cycline an einer sogenannten negativen „feedback“ Regulation beteiligt (Meimoun, Holtzman et al. 2000; Shemer, Meimoun et al. 2002; Wilson and Roach 2002).

Welches der Pho85 Cycline für die Stabilisation des Ash1 Proteins verantwortlich ist konnte bislang noch nicht eindeutig bewiesen werden. *In vitro* Daten lassen darauf schließen, daß ein Pho80-Pho85 Komplex in der Lage ist Ash1p zu phosphorylieren (McBride, Sil et al. 2001). Allerdings ist eine Substratspezifität *in vitro* mit Vorsicht zu behandeln, da die physiologischen Bedingungen *in vivo* oftmals nicht gewährleistet werden können. Überlappende Funktionen der einzelnen Pcl-Familien-Mitglieder sind zudem nicht auszuschließen.

1.7 Morphologische Differenzierung

Die Funktion von Ash1p ist nicht auf die Regulation der *HO*-Transkription begrenzt. Diploide Hefezellen exprimieren und lokalisieren Ash1p im Tochternucleus, obwohl Ash1p in *a/α* Zellen nicht für die Reprimierung der *HO*-Endonuclease benötigt wird. *HO* wird in diploiden Zellen durch das Heterodimer $\alpha 2$ -a1 reprimiert. Chandarlapaty und Errede konnten Ash1p eine essentielle Funktion in einem Differenzierungsprozess diploider *S. cerevisiae* Zellen zuordnen. Ash1p spielt eine bislang nicht exakt erforschte Rolle im pseudohyphalen Wachstum von Hefezellen (Chandarlapaty and Errede 1998).

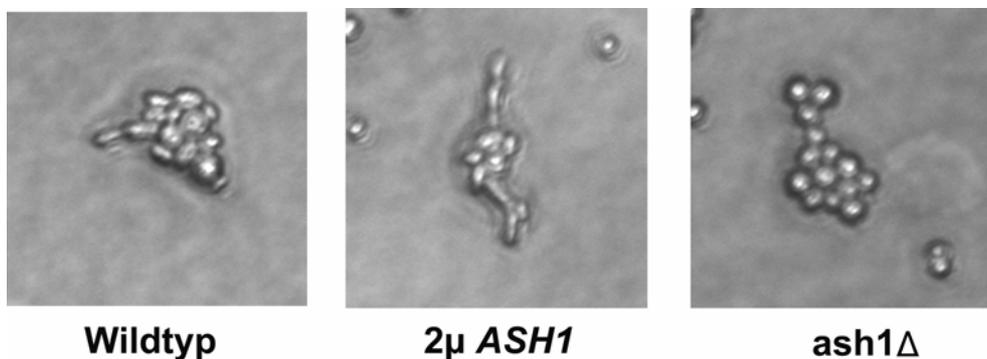


Abb. 1-8 Pseudohyphale Kolonienformation. Eine Überexpression von *ASH1* führt zu einem verstärkten pseudohyphalen Wachstum, während eine *ash1* Mutation die Ausbildung von Pseudohyphen nahezu komplett unterbindet.

Hefezellen besitzen verschiedene Programme, um auf Änderungen in ihrer Umgebung zu antworten. Die meisten hiervon beziehen sich neben der Stressanpassung auf das Nahrungsangebot. Das Nahrungsangebot in der Umgebung der Zelle entscheidet über Wachstum, Vermehrung, Entwicklung, und Differenzierungsprozesse derselbigen (Madhani 2000). Der Restriktionspunkt, an dem die Zelle anhand des Status der Nährstoffe über ihre Weiterentwicklung entscheidet, liegt zwischen der G1- und S-Phase des Zellzyklus. Mutter und Tochterzellen verbleiben während ihrer Wachstumsphase in der G1-Phase. Üblicherweise erreicht die Mutterzelle schneller die zur Zellteilung notwendige Größe. Ist der START-Punkt einmal überschritten, sind der Übergang zur S-Phase und der vollständige Ablauf eines Zellzyklus unwiderruflich eingeleitet.

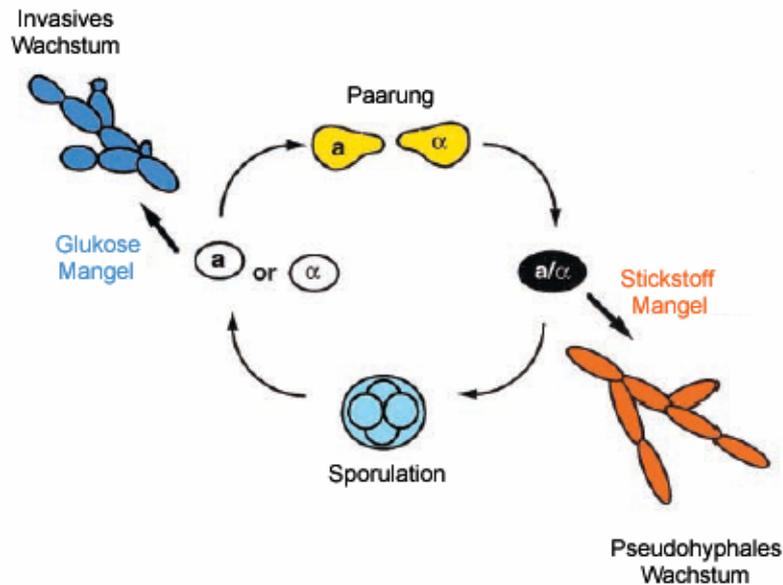


Abb. 1-9 Entwicklungsoptionen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Madhani 2000). Haploide a oder α Zellen differenzieren sich zu einer filamentösen Wachstumsform aufgrund von Glukosemangel oder sie verpaaren sich um diploide a/ α Zellen zu bilden. Diploide Zellen bilden bei Stickstoffmangel Pseudohyphen aus. Wenn diploiden Zellen zusätzlich auch Glukose fehlt wird die Meiose eingeleitet, die Zellen sporulieren, um dann bei ausreichender Nahrung haploide Gameten auszubilden.

Im Falle von Stickstoffmangel ist *S. cerevisiae* durch Umprogrammierung ihres Zellzyklus in der Lage, in ein filamentöses Wachstum zu wechseln. Es stellt für die Hefe eine Möglichkeit dar, durch Erweiterung der Kolonie-Grenze auf „Nahrungssuche“ zu gehen. Die Zellen dringen hierbei auch in den Nährboden ein, auf dem sie sich befinden. Für Hefepilze in der Natur ist dies ein unabdingbarer Mechanismus, um zu überleben. Das filamentöse oder pseudohyphale Wachstum unterscheidet sich nicht nur in seiner verkürzten G1-Phase von der normalen Form. Es kommt zu wesentlichen Unterschieden in der Morphologie der Zelle bzw. der Zellkolonie. Während im Nahrungsüberfluß die diploiden Zellen rundlich sind, sich nach einem bipolaren Knospungsmuster asymmetrisch und vollständig teilen, kommt es unter Mangelbedingungen (hauptsächlich Stickstoffmangel) zu einer Verzögerung der G2/M-Phase; die Zellen knospen unipolar und symmetrisch. Trotz vollständiger Zellteilung bleiben die Mutter- und Tochterzellen physisch miteinander verknüpft. Man spricht hier von Pseudohyphen, da die Aneinanderreihung der Zellen den unseptierten Hyphenmycelien anderer Klassen wie z.B. der Zygomyceten ähnelt.

Im Vergleich zu diploiden Zellen ist der dimorphe Wechsel in haploiden Hefezellen subtiler. Die Zellen weisen zwar eine verstärkte Zell-Zell-Adhesion auf, jedoch sind die morphologischen Unterschiede nur schwach ausgeprägt (Gimeno, Ljungdahl et al. 1992;

Kron, Styles et al. 1994; Blacketer, Madaule et al. 1995; Mosch and Fink 1997; Madhani 2000; Palecek, Parikh et al. 2002).

Die Signaltransduktionswege, die den Dimorphismus hervorrufen, sind in haploiden und diploiden Hefezellen die gleichen. Es handelt sich hierbei um komplexe Signalkaskaden mit parallelen, überkreuzenden und rückkoppelnden Mechanismen. Am besten charakterisiert sind wohl die cAMP-abhängige Protein Kinase- und die STE-MAPK- Kaskade. Beide Signalwege werden durch das GTP-bindende Protein Ras2p aktiviert, welches im Fall der MAPK-Kaskade die GTPase Cdc42p aktiviert und im cAMP Signaltransduktionsweg mit der Adenylatcyclase Cyr1p interagiert (Stanhill, Schick et al. 1999; Gancedo 2001). Ein Ash1p-abhängiger Weg scheint sich sehr früh von der STE-MAPK-Kaskade abzuzweigen. *ASH1* Überexprimierung kann den Verlust des pseudohyphalen Wachstums in *ste7Δ* und *ste12Δ* Mutanten wieder aufheben, nicht jedoch in *ste20Δ* Zellen (Chandarlapaty and Errede 1998). Ste20p besitzt Serin/Threonin Kinase-Aktivität. Sie phosphoryliert zusammen mit der Membran-gebundenen GTPase Cdc42p und den 14-3-3 Proteinen Bmh1p und Bmh2p, die Kinase Ste11p. Es kommt zur Interaktion von Ste11p mit dem Adaptorprotein Ste50p. Dies hat die Phosphorylierung der MAP Kinase Kinase Ste7p und Kss1p zur Folge, was letztendlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *STE12* führt. Nicht-phosphoryliertes Kss1p interagiert mit den beiden negativen Regulatoren Dig1p und Dig2p, die den Transkriptionsfaktor Ste12p blockieren. Aktiviertes Ste12p und Tec1p wiederum sind in der Lage als Heterodimer die Expression von Tec1p selbst oder Flo11p zu regulieren. Flo11p ist ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Zelloberflächenprotein, das für die Kalzium-abhängige Zell-Zell-Adhesion („Flocculation“) benötigt wird. Außerdem ist es essentiell für pseudohyphales und invasives Wachstum. Die Expression von Flo11p wird sowohl durch den MAP Kinase- als auch cAMP-Signaltransduktionsweg aktiviert (Loeb, Kerentseva et al. 1999; Pan, Harashima et al. 2000; Gancedo 2001). Der Transkriptionsfaktor *SOK2* ist durch negative Regulation der Expression der Gene *PHD1*, *SWI5* und *ASH1* ebenfalls an der Aktivierung des Proteins Flo11 beteiligt. Diese Proteine sind keine Mitglieder der MAPK- und cAMP-Kaskaden, bzw. grenzen sich möglicherweise sehr früh von diesen ab (Ash1p) (Pan and Heitman 2000).

Bni1p wird *in vivo* Ste20p-abhängig phosphoryliert. Zellen die kein funktionelles Bni1p besitzen, sind nicht mehr fähig, filamentös zu wachsen (Mosch and Fink 1997). In welchem Zusammenhang diese Daten mit dem Phänotyp der *ash1Δ* Zellen stehen ist nicht geklärt. Eine asymmetrische Lokalisation des Ash1 Proteins konnte von Chandarlapaty und Errede auch in pseudohyphal wachsenden Zellen gezeigt werden (Chandarlapaty and Errede 1998).

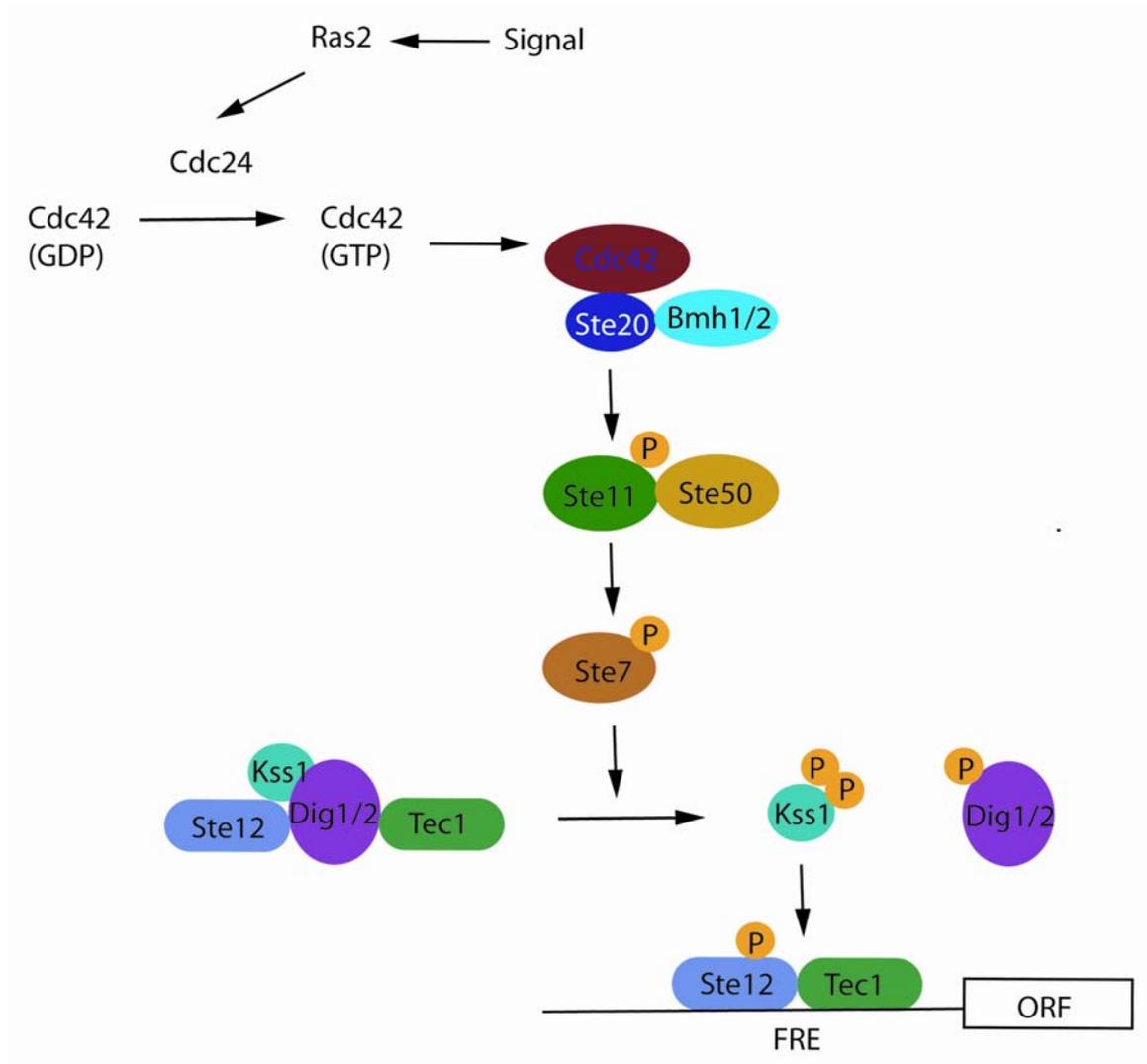


Abb. 1-10 Die MAP-Kinase-Kaskade, die zu pseudohyphalem und invasivem Wachstum führt. Ein externes Signal aktiviert Ras2, was über verschiedene Aktivierungsschritte die Phosphorylierung der MAPKKK Ste11, der MAPKK Ste7 und der MAPK Kss1 zur Folge hat. Die Zielgene dieses Signaltransduktionsweges sind Gene mit einem FRE-Element in ihrem Promotor (Gancedo 2001).

1.8 Der humanpathogene Pilz *Candida albicans*

Dimorphismus, wie er in *Saccharomyces cerevisiae* vorzufinden ist, ist ein charakteristisches Merkmal vieler Pilze. *Ustilago maydis*, ein phytopathogener Pilz, der in Maispflanzen den Maisbeulenbrand hervorruft, sowie der humanpathogene Pilz *Candida albicans* wenden die Möglichkeit zwischen knospenden und hypahlen bzw. pseudohypahlen Wachstum zu wechseln, als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen an (Sanchez-Martinez and Perez-Martin 2001). Oftmals geht der Di- oder Polymorphismus mit einer gesteigerten Virulenz der

pathogenen Pilze einher (Shepherd, Poulter et al. 1985; Lo, Kohler et al. 1997; Madhani and Fink 1998; Navarro-Garcia, Sanchez et al. 2001; van Burik and Magee 2001).

C. albicans wird den *fungi imperfecti* zugeordnet. Hierzu gehören all jene Pilze deren ursprüngliche Vegetationsformen nicht bekannt sind. *C. albicans* ist Mitglied der Familie der Blastomycetales. Diese vermehren sich hefeartig sprossend ohne bekannte sexuelle Stadien.

Wenngleich es sich bei dem Pilz *Candida albicans* um ein opportunistisches Pathogen handelt, kann es in immunsuppressiven Patienten lebensbedrohliche systemische Mykosen auslösen. In gesunden Lebewesen lebt *C. albicans* als Kommensal, koexistiert mit diesen ohne negative Konsequenzen. Ist das Immunsystem des Wirtes erst einmal geschwächt, nutzt *C. albicans* die Gelegenheit zur richtigen Zeit am richtigen Ort zu sein und vermehrt sich verstärkt. Es wird vermutet, daß der Polymorphismus des pathogenen Pilzes ihm die Möglichkeit gibt, ins Gewebe zu invasieren und somit als Virulenz-Determinante dient. Das Wechseln von der sprossenden in die (pseudo-)hyphale Lebensform wird durch Umgebungsveränderungen, wie Temperatur, pH oder limitierte Nährstoffe ausgelöst (Madhani and Fink 1998). Ähnlich wie in *Saccharomyces cerevisiae* wird aufgrund externer Signale das pseudohyphale Wachstum durch eine MAPK- oder cAMP-Kaskade in die Wege geleitet. Bei den Komponenten dieser Signaltransduktionswege handelt es sich hauptsächlich um Homologe der Mitglieder in *S. cerevisiae*. Bislang konnten jedoch noch nicht alle beteiligten Proteine in *C. albicans* identifiziert werden. Funktionelle Genomanalysen in *C. albicans* waren bisher ein schweres Unterfangen, durch die Diploidie, die Asexualität und dem außergewöhnlichen Gebrauch des CUG-Kodons (Ernst 2000; Ernst 2000). Durch das *Candida albicans* Sequenzierungsprogramm des Stanford Genome Technology Centers und aufgrund des schnellen Entwickelns molekularbiologischer Techniken speziell für *Candida albicans* gewinnt *C. albicans* jedoch an Beliebtheit als Modellorganismus pathogener Pilze.

Die MAP-Signaltransduktionskaskade, die in *S. cerevisiae* den Verpaarungsprozess zweier haploider Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp auslöst, teilt sich Gene, die auch für den Wechsel der Wachstumsform verantwortlich sind. Im Laufe des *C. albicans* Sequenzierungsprojektes wurden nicht nur Homologe, die für die Entscheidung sprossendes oder (pseudo-) hypahles Wachstum wichtig sind, identifiziert. Anhand von Sequenzähnlichkeiten wurden Genhomologien charakterisiert, die sowohl in Paarungsvorgängen, als auch in Sporulation und Meiose involviert sind (Nantel, Dignard et al. 2002). Die wohl erstaunlichste Entdeckung war der MTL (mating-type-like) Locus im *Candida albicans* Genom (Hull and Johnson 1999; Magee and Magee 2000; Whiteway 2000). Dieser Locus ähnelt dem MAT-Locus der Bäckerhefe in zwei Aspekten. Der MTL-Locus

codiert für Proteine, die den drei Transkriptionsregulatoren ($\alpha 1$, $\alpha 1$ und $\alpha 2$), die vom MAT-Locus transkribiert werden, gleichen. Außerdem ist der MTL-Locus heterozygot in dem daraufhin untersuchten diploiden *C.albicans* Laborstamm, d.h. es befindet sich ein $\alpha 1$ -ähnliches Gen auf einem Chromosom, während auf dem zweiten sich $\alpha 1$ und $\alpha 2$ -ähnliche Gene befinden (Hull and Johnson 1999; Magee and Magee 2000). Obwohl für *C.albicans* nie ein haploides Stadium oder Prozesse wie Meiose und Sporulation gezeigt werden konnten, ist ein artifizieller *MTLa/mtla* Δ Stamm in der Lage, sich mit einem genetisch veränderten *mtla* Δ /*MTLa* Stamm zu verpaaren. Ob die tetraploiden Nachkommen in der Lage sind, durch Meiose wieder diploide Nachfahren zu erzeugen ist bislang nicht erwiesen. Zwar besitzt *C.albicans* die erforderlichen homologen Gene für einen kompletten sexuellen Lebenszyklus wie er in *S.cerevisiae* vorzufinden ist; auch eine typische Rekombinationshäufigkeit konnte gezeigt werden. Ob aber und in welchen natürlichen Situationen *Candida albicans* diesen Weg der Fortpflanzung wählt ist ungeklärt (Hull, Raisner et al. 2000; Tzung, Williams et al. 2001).

Den diploiden Status kann eine Zelle auch durch einen sogenannten parasexuellen Zyklus wiedererlangen. Hierbei handelt es sich um mitotische Reduktionsteilungen, bei denen der Zelle willkürlich Chromosomen verloren gehen. Bennett und Johnson konnten dies kürzlich in *Candida albicans* Laborstämmen künstlich induzieren. Der detaillierte Mechanismus ist nicht bekannt. Es scheint jedoch eine alternative Methode zur Meiose zu sein, um die unter Stress erforderlichen genetischen Umstrukturierungen für die Nachfahren eines Organismus zu erhalten.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor *ASH1* hat eine wichtige Funktion im Differenzierungsprozess der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Neben der Repression der für den Paarungstypwechsel notwendigen *HO*-Endonuclease, hat Ash1p eine bislang nicht näher charakterisierte Rolle im pseudohyphalen Wachstum.

Die Tatsache, daß bei der Sequenzierung des Genoms eines humanpathogenen Pilzes, *Candida albicans*, ein putatives *ASH1*-Homolog identifiziert wurde, macht die Suche nach möglichen Zielgenen dieses GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktors doppelt interessant.

Neue Methoden zur Identifizierung regulierter Gene auf der Basis ihrer Transkription ermöglichen eine schnelle Erfassung der Ziele verschiedenster Proteine. Mit Hilfe der

Microarray Technik machte ich mich am Beginn dieser Arbeit auf die Suche nach vermeintlichen Zielgenen des Ash1 Proteins. Ferner sollte eine funktionelle Charakterisierung möglicher Ziele mittels molekular- und zellbiologischer Methoden erfolgen.

Zudem bestand ein Teil dieser Arbeit daraus, das *C.albicans ASH1*-Homolog näher zu charakterisieren. Durch die funktionelle Analyse des *C.albicans ASH1* sollten denkbare Analogien zum *S.cerevisiae ASH1* aufgedeckt werden.

2 Ergebnisse

Der GATA-ähnliche Transkriptionsfaktor *ASH1* ist in haploiden Zellen essentiell für die zell-spezifische Repression der *HO*-Endonuclease. Desweiteren hat *ASH1* eine bislang ungeklärte Rolle in der pseudohyphalen Differenzierung diploider Hefezellen. GATA-ähnliche Faktoren können sowohl als Repressoren als auch Aktivatoren fungieren. Bislang konnten aber neben *HO* keine weiteren Zielgene des Transkriptionsfaktors *ASH1* identifiziert werden.

Das *Candida albicans* Sequenzierungsprojekt (<http://www.sequence.stanford.edu/group/candida>) identifizierte eine DNA Sequenz, die möglicherweise für ein Homolog des *Saccharomyces cerevisiae* *ASH1* codiert.

K.Kahlina isolierte mit Hilfe dieser Sequenzinformation aus einer *Candida albicans* Bibliothek das *C.albicans* *ASH1* (*CaASH1*) (Diplomarbeit K.Kahlina, Universität Heidelberg, 2001). Die komplette Sequenz codiert für ein 452 Aminosäuren Protein. Im C-Terminus befindet sich eine Zink-Finger-Domäne, die der GATA-ähnlicher Transkriptionsfaktoren gleicht. Im aminoterminalen Bereich ist ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) vorzufinden. Die Homologie zum 588 Aminosäuren langen *S.cerevisiae* *ASH1* (*ScASH1*) ist mit einer 57% Identität im C-Terminus sehr hoch (Abb.2.1). Ein phylogenetischer Vergleich zeigt, daß *CaAsh1p* *ScAsh1p* ähnlicher ist als anderen *S.cerevisiae* GATA-Faktoren. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob auch die Funktionen der Homologe konserviert sind.

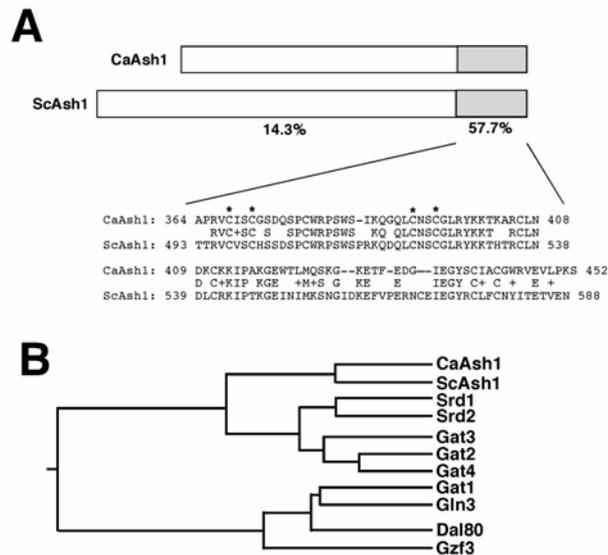


Abb. 2-1 CaAsh1p ist ein GATA-ähnlicher Transkriptionsfaktor mit Ähnlichkeiten zu Ash1p. A Vergleich von CaAsh1 und ScAsh1. Die Prozentzahlen zeigen die Homologie der Amino- und Carboxy-terminalen Regionen. B Phylogenetischer Baum von CaAsh1 und GATA-ähnlichen Faktoren aus *S.cerevisiae* (Munchow, Ferring et al. 2002).

2.1 *Candida albicans* *ASH1* hat eine konservierte Funktion in der pseudohyphalen Differenzierung

Die Regulation der *HO*-Endonuclease kann mit Hilfe des *HO-ADE2*-Reportersystems untersucht werden (Jansen, Dowzer et al. 1996). Sofern ein funktionelles Ash1 Protein in der Hefezelle vorhanden ist, wird das Reportergen *ADE2* reprimiert und die Zellen können auf Adenin-freiem Medium nicht überleben. Bobola et al. konnte zeigen, daß eine Überexpression von *ScASH1* in haploiden Hefezellen die *HO* und *HO-ADE2* Expression inhibiert (Bobola, Jansen et al. 1996). Um zu überprüfen, ob *CaASH1* *HO-ADE2* reprimieren kann, wurde zunächst dessen codierende Sequenz als PstI Fragment (welches 501bp der 5'UTR und 452bp der 3'UTR beinhaltet) in ein 2 μ -Plasmid (YEplac195) integriert und in einen *ash1-12* Stamm transformiert. Dieser Stamm besitzt eine Mutation im *ADE2*-Gen und das *HO-ADE2* Reportersystem. Unter Adenin-Mangelbedingungen ist das Wachstum von *ade2⁻* Stämmen in Anwesenheit des Reportersystems ein direktes Maß für eine Aktivität des *HO*-Promotors. Die

Überexpression von *CaASH1* von einem 2 μ Hefevektor kann die *HO-ADE2* Expression nicht ausreichend effizient reprimieren (Abb.2.2A) Die Zellen sind in der Lage, auf Adenin-freiem Medium zu wachsen. Zellen, die *ScASH1* von einem 2 μ Vektor überexprimieren, sind in der Lage die Expression von *HO-ADE2* komplett zu reprimieren. Ein Überleben dieser Zellen auf Adenin-freiem Medium ist nicht möglich, während das Wachstum der Zellen auf Uracil-freiem Medium nicht beeinflusst wird.

Mit einer Northernblot-Analyse konnte gezeigt werden, daß *CaASH1* in *S.cerevisiae* exprimiert wird (Abb.2.2B). In Zellen, die *CaASH1* überexprimieren, wurde mit einer *CaASH1*-Sonde ein 1,4 Kbp großes Transkript detektiert. Das *ScASH1* Transkript wird auch in den Zellen detektiert, die *ScASH1* nicht überexprimieren, da es sich um ein mutiertes *ASH1* Allel (*ash1-12*) handelt. Dieses mutierte Allel führt zu einem nicht funktionellen ScAsh1 Protein (Bobola, Jansen et al. 1996), welches nicht in der Lage ist, die Transkription des *HO-ADE2* Reporters zu reprimieren (Abb.2.2B). Als Negativkontrolle wurde der leere 2 μ Vektor verwendet. Hier wird zwar ebenfalls das mutierte *ASH1* Allel detektiert, aber *HO-ADE2* kann durch das nicht funktionelle Ash1 Protein nicht reprimiert werden. Der *HO*-Promotor ist aktiv und die Transkription des *HO-ADE2* Reporter-Gens wird initiiert.

Stickstoffmangel löst in diploiden *S.cerevisiae*-Zellen die Pseudohyphen-Formation aus. *ASH1* spielt eine bislang nicht genauer definierte Rolle im pseudohyphalen Wachstum. Die Überexpression von *ASH1* verstärkt die Ausbildung der Pseudohyphen, während eine Deletion des *ASH1*-Gens zu einer drastischen Reduktion des pseudohyphalen Wachstums führt (Chandarlapaty and Errede 1998). *Candida albicans* wendet diesen Dimorphismus ebenfalls als Antwort auf Umweltveränderungen an. Kann das vermeintliche Homolog *CaASH1* den pseudohyphalen Defekt einer *ash1 Δ* Mutante komplementieren?

Das 1,9 Kbp *CaASH1* PstI-Fragment wurde in einen centromerischen Vektor kloniert und in einen *ash1 Δ* Stamm transformiert. Eine einzelne Kopie des *CaASH1* Gens ist ausreichend, um *ash1 Δ* zu komplementieren. Die Hefezellen sind wieder in der Lage, auf SLAD-Medium (Gimeno, Ljungdahl et al. 1992) Pseudohyphen auszubilden (Abb.2.2C), ebenso wie eine einzelne Kopie des *ScASH1* Gens die Funktion wiederherstellt.

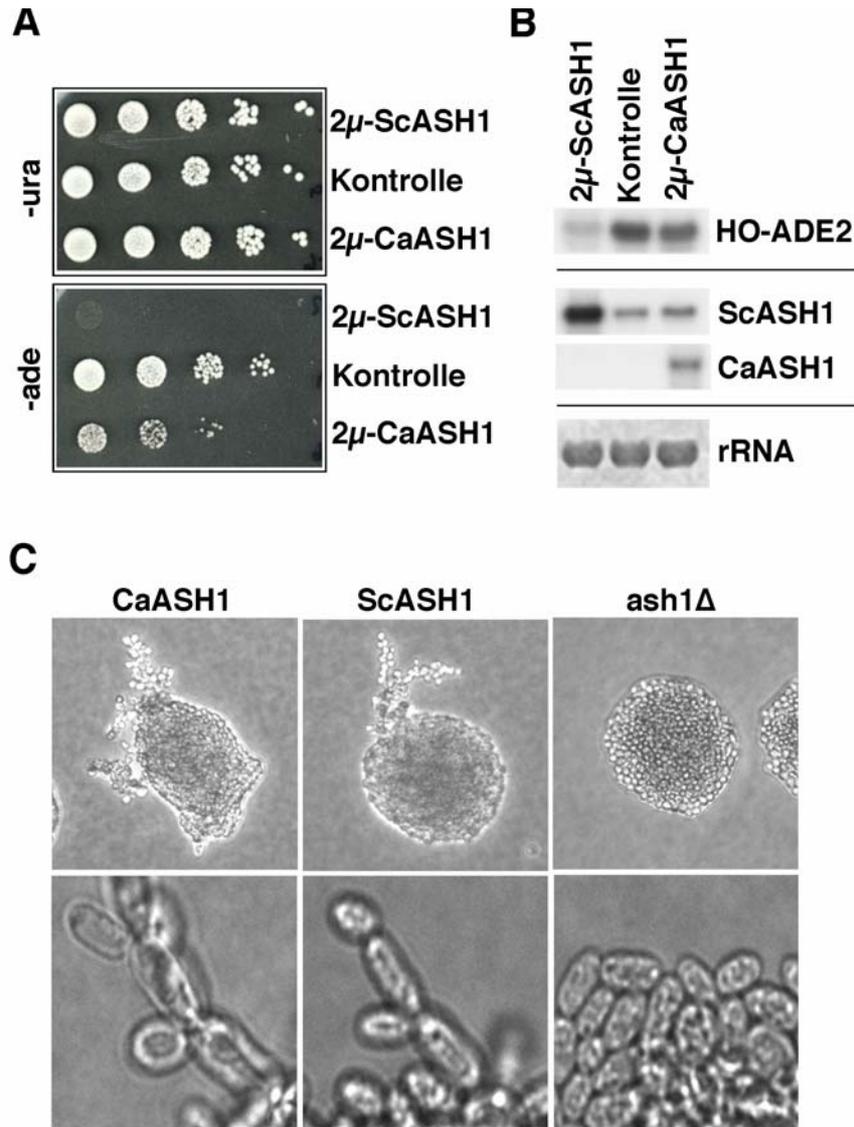


Abb. 2-2 A-C *CaASH1* komplementiert den pseudohyphalen Wachstumsdefekt einer *ash1Δ* Mutante, nicht aber den Defekt in der Repression der *HO* Expression. A Misslingen der *HO-ADE2* Repression in *ash1-12* Mutanten, transformiert mit 2μ *CaASH1*. Je 5μl einer logarithmisch wachsenden Kultur, die mit einem 2μ Plasmid transformiert wurde, welches entweder leer ist oder *CaASH1* bzw. *ScASH1* beinhaltet, wurde in einer Verdünnungsreihe auf -ura und -ade Medium aufgetragen. Die Abbildung wurde nach drei Tagen Wachstum bei 30°C aufgenommen. B Northernblot-Analyse der *HO-ADE2*, *ScASH1* und *CaASH1* Expression in den Stämmen, die in A benutzt wurden. *HO-ADE2* wird reprimiert wenn *ScASH1* überexprimiert wird, nicht aber bei Überexpression von *CaASH1*. Ladekontrolle: Methyleneblau gefärbte rRNA. C Pseudohyphales Wachstum auf SLAD Medium (Gimeno, Ljungdahl et al. 1992). Kolonie-Morphologie (oben) und einzelne Zellen am Rande der jeweiligen Kolonie (unten). Komplementiert wurde ein *ash1Δ* Stamm mit einzelnen Kopien von *CaASH1* oder *ScASH1*. Der Kontrollstamm (*ash1Δ*) war mit einem leeren Plasmid transformiert.

Wechseln Hefezellen zum pseudohyphalen Wachstum, verändert sich unter anderem auch die Form der einzelnen Zellen von rundlich zu länglich. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen morphologische Veränderungen in Zellen, die *CaASH1* oder *ScASH1* exprimieren. Nach dreitägigem Wachstum auf Pseudohyphen-induzierendem SLAD-Medium bei 30°C wurde die Zellmorphologie statistisch ausgewertet (Tabelle 2.1). Die Kolonien bestehen aus einem Gemisch aus rundlichen, ovalen und länglichen Zellen. Die Fraktion der länglichen Zellen spiegelt den Grad der pseudohyphalen Induktion wider. Als länglich werden die Zellen bezeichnet, deren Länge/Breite Verhältnis >2 ist.

<u>Morphologie</u>	<u><i>ash1Δ</i></u>	<u><i>ScASH1</i></u>	<u><i>CaASH1</i></u>
rund	47 ± 7,4	21 ± 4,2	25 ± 3,3
oval	110 ± 12,8	99 ± 13,3	123 ± 16,4
länglich	10 ± 4,1	63 ± 8,1	51 ± 6,0
Gesamtanzahl	167	183	199

Tabelle 2.1 Zellmorphologie der *ash1Δ* Stämme, komplementiert mit *ScASH1* oder *CaASH1* bzw. mit leerem Vektor (*ash1Δ*). Es wurde jeweils das Längen/Breiten (L/B) Verhältnis von 150-200 Zellen pro Stamm ermittelt. $L/B \leq 1$ rund; $L/B > 1 < 2$ oval; $L/B > 2$ länglich.

Ein *ash1Δ* Stamm, der nicht mehr in der Lage ist Pseudohyphen auszubilden, hat pro Kolonie nur eine geringe Anzahl länglicher Zellen. Wird ein solcher Stamm mit *ScASH1* oder *CaASH1* komplementiert, erhöht sich die Anzahl der länglichen Zellen von 6% auf 31% bzw. 25%.

CaASH1 kann die Rolle von *ASH1* aus *S.cerevisiae* in der Repression der *HO*-Endonuclease in haploiden Hefezellen nicht übernehmen, aber eine Expression des *CaASH1* in diploiden *ash1Δ*-Zellen führt zu morphologischen Veränderungen ähnlich derer, die durch Expression von *ScASH1* herbeigeführt werden.

2.2 CaAsh1p ist ein asymmetrisch lokalisiertes nukleäres Protein

Saccharomyces cerevisiae Ash1p akkumuliert spezifisch im Tochterkern sich teilender Zellen, wo es die Expression der *HO*-Endonuclease reprimiert. Die Tochterzell-spezifische Lokalisation ist nicht nur auf haploide Zellen beschränkt. Auch in diploiden Hefezellen wird Ash1p im Tochterzellkern lokalisiert. Das *Candida albicans* Homolog *CaASH1* ist in der

Lage, die Funktion des *ScASH1* in diploiden Zellen im Bezug auf das pseudohyphale Wachstum zu übernehmen. Akkumuliert CaAsh1p, in dessen Sequenz ein nukleäres Lokalisationssignal vorzufinden ist, ebenfalls spezifisch im Tochterzellkern?

Um eine mögliche asymmetrische Verteilung des CaAsh1 Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* zu untersuchen, wurde zunächst die codierende Sequenz von *CaASH1* und als Positivkontrolle von *ScASH1* mit dem yEGFP (yeast enhanced GFP)-Gen fusioniert (Cormack, Bertram et al. 1997) und unter die Kontrolle eines reprimierbaren *MET25* Promotors gestellt. In Methionin-freiem Medium wird der *MET25* Promotor dereprimiert und das Fusionsprotein exprimiert. Eine Endkonzentration von 2mM Methionin in einer Übernachtskultur gewährleistet eine vollständige Repression des *MET25* Promotors. Nach einer zweistündigen Induktion in Methionin-freiem Medium kann die Lokalisation des CaASH1-yEGFP Proteins in lebenden Zellen analysiert werden (Abb.2.3). Die Fusionsproteine yEGFP-CaAsh1 und yEGFP-ScAsh1 sind spezifisch im Zellkern angereichert. Während die Negativkontrolle (yEGFP alleine) eine diffuse Hintergrundfärbung vorweist. In Zellen, die sich kurz vor ihrer Zellteilung befinden und bereits zwei Zellkerne besitzen, sind die Fusionsproteine asymmetrisch auf nur einen Zellkern verteilt. Hierbei handelt es sich um den Zellkern der Tochter, die kleiner als die Mutterzelle ist. CaAsh1p ist ebenso wie sein Homolog in *S.cerevisiae* ein asymmetrisch verteiltes nukleäres Protein.

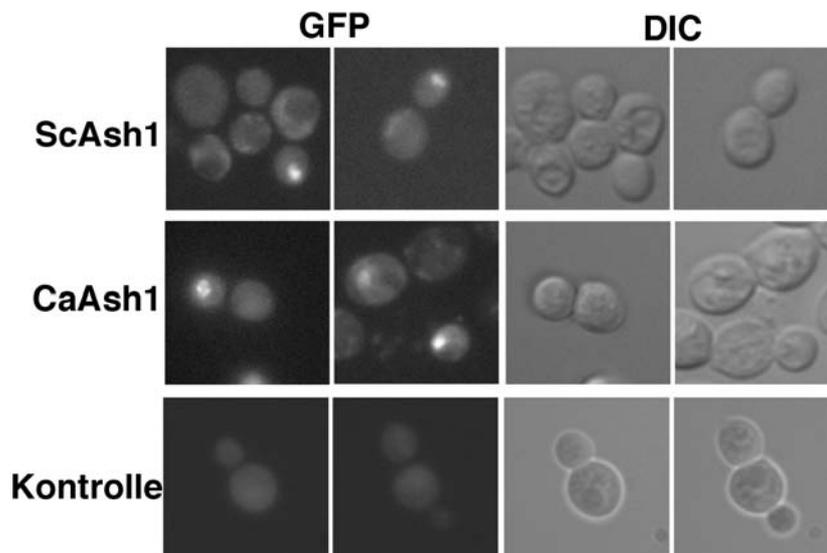


Abb. 2-3 Tochtterspezifische Akkumulation von yEGFP-CaAsh1 und yEGFP-ScAsh1. Die Expression der Fusionsproteine oder yEGFP alleine (Kontrolle) wurde vom *MET25* Promotor reguliert. Zu sehen sind CaAsh1p- und ScAsh1p-Signale spezifisch im Tochterzellkern. Die Tochter kann durch ihre Größe von der Mutter unterschieden werden. Die Kontrolle zeigt eine diffuse Hintergrundfärbung (Munchow, Ferring et al. 2002).

Die Ursache der asymmetrischen Verteilung des *S.cerevisiae* Ash1 Proteins ist die Lokalisation der mRNA an die Spitze der Tochterzelle während der Mitose (Long, Singer et al. 1997; Takizawa, Sil et al. 1997). Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die asymmetrische Verteilung des CaAsh1 Proteins ebenfalls auf der Lokalisation seiner mRNA basiert. Es war nicht bekannt, ob die *CaASH1* Expression ausreichend ist, um mRNA Signale in der *in situ* Hybridisierung zu detektieren. Aus diesem Grund wurde die codierende Sequenz des *CaASH1* Gens unter die Kontrolle des *ScASH1* Promotors gestellt, welcher nur in spät-mitotischen Zellen aktiv ist (Bobola, Jansen et al. 1996). Parallel wurde die *in situ* Hybridisierung mit Zellen durchgeführt, die *CaASH1* mit eigenem Promotor von einem 2 μ Vektor exprimieren. Für die *in situ* Hybridisierung in *S.cerevisiae* wurden DIG-markierte *CaASH1* und *ScASH1 antisense*-Transkripte hergestellt. Diese binden an die *CaASH1* bzw. *ScASH1* mRNA und werden mit Hilfe eines Maus-anti-DIG Antikörper und eines sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers (Kaninchen-anti-Maus Alexa 488) detektiert.

In situ Hybridisierungs-Signale mit anti-*ScASH1* Sonden sind mondsichelartig an der Spitze der Tochterzelle zu erkennen (Abb.2.4 D,E) (Takizawa, Sil et al. 1997). Im Gegensatz hierzu sind *CaASH1* mRNA Signale nie als cortical-begrenzte Signale zu sehen. *CaASH1* mRNA wird zwar asymmetrisch in der Tochterzelle lokalisiert, ist aber nie als distinktes Signal an der Spitze der Tochterzelle zu sehen (Abb.2.4 A-C). Unabhängig ob *CaASH1* unter der Kontrolle seines eigenen Promotors oder des *ScASH1* Promotors steht, sind die *CaASH1* Signale nur zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellzyklus zu erkennen (Abb.2.4 G-I). Auch unter dem eigenen Promotor akkumuliert *CaASH1* mRNA in der Tochterzelle nur in spät-mitotischen Zellen. Die Kontrolle (Abb.2.4 F) zeigt, daß die *CaASH1*-Sonden spezifisch an die *CaASH1* mRNA hybridisieren. In einem Stamm der *CaASH1* nicht exprimiert sind nur sehr schwache, diffuse Hintergrund-Signale zu erkennen.

CaASH1 übernimmt nicht nur teilweise Funktionen von *ScASH1* in *S.cerevisiae*, sondern besitzt scheinbar ebenfalls Lokalisations-signale und wird von der *ScASH1* mRNA Transportmaschinerie erkannt (Chartrand, Singer et al. 2001).

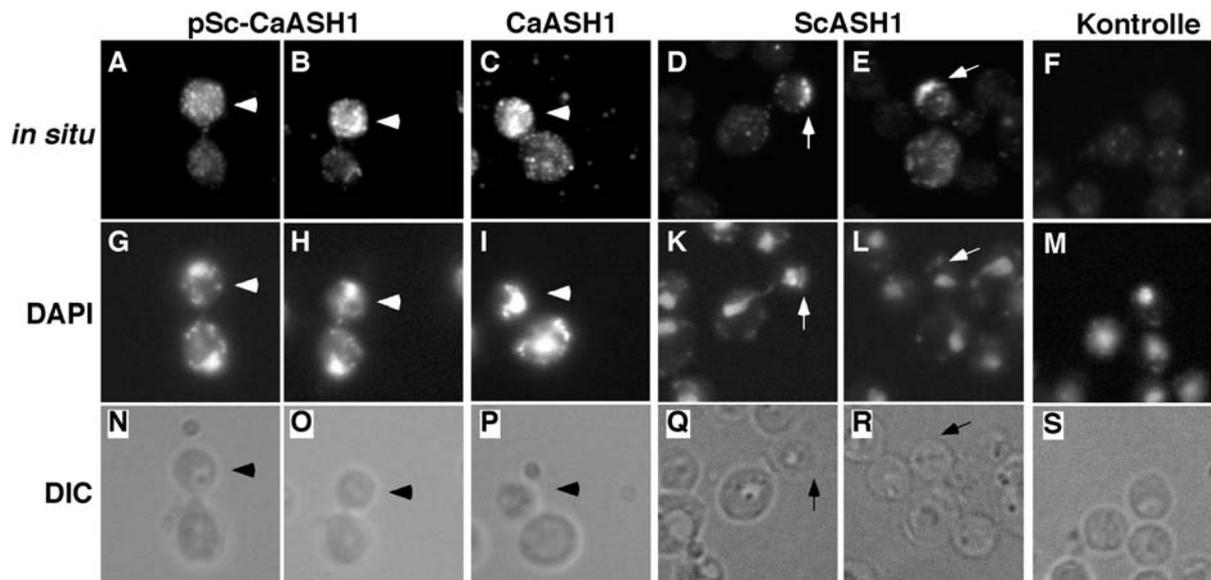


Abb. 2-4 Asymmetrische Verteilung der *CaASH1* und *ScASH1* mRNA in *S.cerevisiae*. Gezeigt sind *in situ* Hybridisierungen von Zellen, die entweder *CaASH1* unter der Kontrolle des *ScASH1* Promotors (A,B) oder unter dem eigenen Promotor (C) exprimieren. Als Positivkontrolle sind *in situ* Hybridisierungen von Zellen, die *ScASH1* exprimieren (D,E) gezeigt. Die Negativkontrolle (F) zeigt eine *in situ* Hybridisierung mit Zellen, die *CaASH1* nicht exprimieren und mit *CaASH1*-Sonden hybridisiert wurden. G-M sind DAPI-Färbungen der jeweiligen Zellen, N-S die DIC-Aufnahmen. Die Pfeilspitzen zeigen auf die Lokalisation der *CaASH1* mRNA, die Pfeile weisen auf die Lokalisation der *ScASH1* mRNA hin (Munchow, Ferring et al. 2002).

2.3 *PCL5* mRNA, eine differentiell exprimierte mRNA

Ein Organismus muß im Laufe seines Daseins viele Differenzierungsvorgänge durchlaufen. Immer wieder wird in seiner Entwicklung und Fortpflanzung oder durch Umweltveränderungen das Expressionsmuster seines Genoms verändert. Die traditionelle Molekularbiologie erlaubte lange Zeit nur „ein Gen-ein Experiment“-Analysen. In den letzten Jahren gelang der Durchbruch einer Technik, die es ermöglicht, die Expression kompletter Genome auf einem Trägermaterial zu analysieren. Die Microarray-Technik erlaubt die gleichzeitige transkriptionelle Analyse mehrerer tausend Gene. Hierdurch werden große Datenmengen produziert. Diese Daten enthalten Meßrauschen und eine nicht zu vernachlässigende Anzahl falsch-positiver Signale. Eine Vielzahl von Firmen bietet nicht nur Microarrays sondern auch dazugehörige Computerprogramme zur statistischen Auswertung der Daten an. Eine statistische Analyse gibt jedoch keinen Aufschluß über die Realität der erhaltenen Daten. Auch ist es nicht möglich im Zeitrahmen einer einzelnen Dissertation die Gesamtheit der Daten mit traditionellen Verfahren zu verifizieren. Aus diesem Grund betrachtete ich es als sinnvoll sich auf einen kleinen Datenanteil zu konzentrieren.

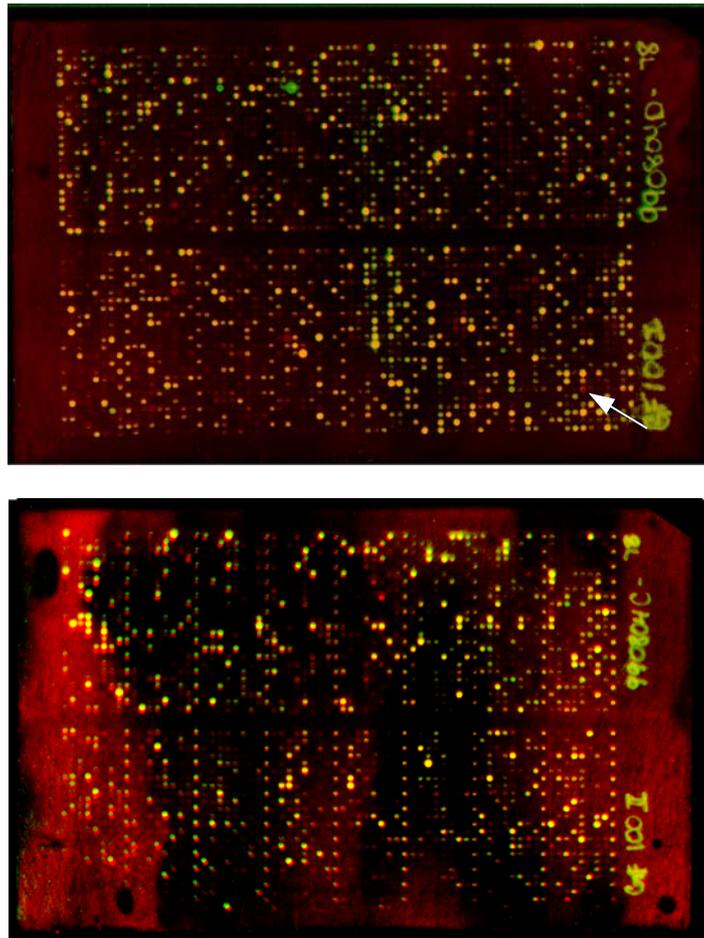


Abb. 2-5 Differenziell exprimierte Gene auf GeneFilters® Microarrays GFI (oben) und GFII (unten). Die Nylonmembranen wurden mit ^{33}P -markierten cDNAs hybridisiert und radiographisch detektiert. Die Nylonmembranen, die mit cDNAs eines *myo4* Δ Stammes hybridisiert wurden, wurden mit Hilfe von Adobe Photoshop 7.0 grün eingefärbt. Nachdem die Membranen gestrippt wurden und anschließend mit cDNAs eines Wildtyp-Stammes hybridisiert wurden, wurden diese mit Hilfe von Adobe Photoshop 7.0 rot eingefärbt und die Abbildungen übereinander gelegt, sodaß gleiche Signalintensitäten gelb erscheinen. Der Pfeil zeigt auf eine mRNA, welche eine geringere Signalintensität im *myo4* Δ Stamm vorweist und aus diesem Grund rot erscheint. Es handelt sich hierbei um *PCL5*.

Die Regulation eines Genes setzt beim ersten Schritt der Genexpression an, nämlich beim Transkriptionsstart. Eine Zelle kann sich den Veränderungen in seiner Umwelt durch eine Veränderung der Konzentration verschiedenster mRNAs anpassen. Die folgenden Schritte sind die Häufigkeit, mit der die mRNA translatiert wird und die Stabilität des Proteins selbst. Die Konzentration einer mRNA ist abhängig von der Transkriptionsrate.

Bei *ASH1* handelt es sich um einen GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktor. GATA-Faktoren können sowohl als Transkriptions-Aktivatoren als auch Repressoren fungieren. *ASH1* könnte also die Transkription verschiedener Gene aktivieren oder reprimieren. Ein bekanntes Zielgen ist *HO*, dessen Expression durch Ash1p reprimiert wird.

In einer gemischten Kultur wird statistisch gesehen in 50% der in der G1-Phase des Zellzyklus befindlichen Zellen *HO* exprimiert. In den Tochterzellen, die Ash1-Protein im Zellkern akkumulieren, wird die *HO*-Expression reprimiert. Eine Deletion eines Genes, welches an der spezifischen Lokalisation der *ASH1* mRNA beteiligt ist, erhöht die Wahrscheinlichkeit der G1-Zellen mit einer spezifischen Regulation eines Zielgenes des Ash1-Proteins auf 100%. Die *ASH1* mRNA wird in einem *myo4Δ* Stamm nicht mehr spezifisch an der Knospenspitze lokalisiert und folglich ist Ash1p symmetrisch auf beide Zellkerne, Mutter- und Tochterzellkern verteilt. Aus diesem Grund wurde zunächst das Expressionsmuster eines *myo4Δ* mit dem eines *myo4/ash1Δ* Stammes verglichen. Alle G1-Zellen in einer *myo4Δ* Kultur haben Ash1p in ihren Zellkernen. Dadurch sollte sich eine Differenz im Expressionsmuster stärker auswirken.

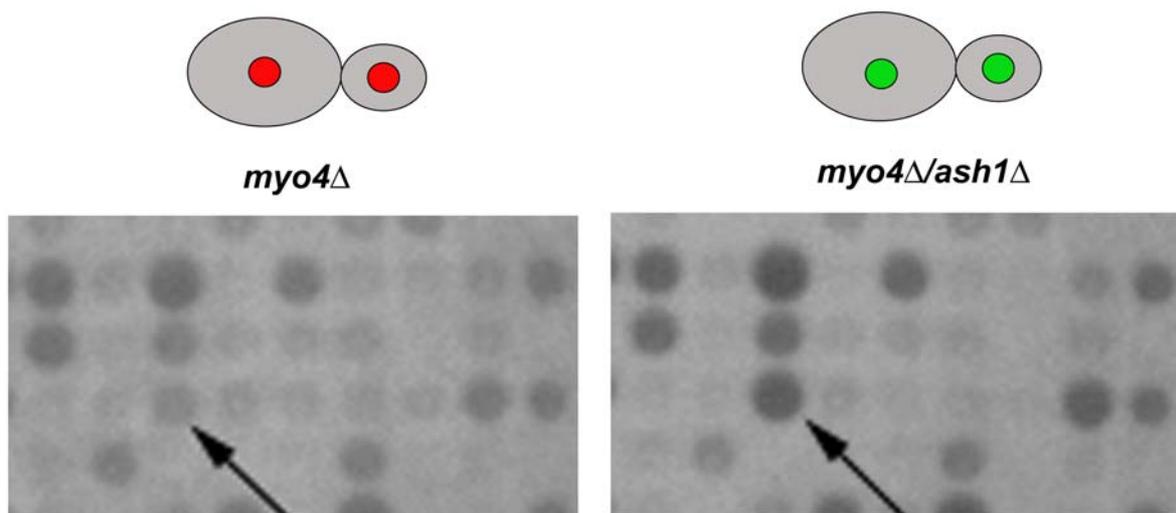


Abb. 2-6 Die Transkriptionsstärke der *PCL5* mRNA (Pfeil) ist in einem *myo4Δ* Stamm deutlich niedriger als in einem *myo4Δ/ash1Δ* Stamm. Die mRNAs wurden jeweils aus einem *myo4Δ* Stamm und einem *myo4Δ/ash1Δ* Stamm isoliert. Die Deletion von *MYO4* führt zu einer symmetrischen Verteilung des Ash1 Proteins (rot). Im Vergleich zum *myo4Δ/ash1Δ* Stamm (Zellkerne: grün) befindet sich Ash1p sowohl im Tochterzellkern als auch im Zellkern der Mutter. Die mRNAs wurden ^{33}P markiert und mit den GeneFilters[®] Microarrays hybridisiert. Zu sehen sind vergrößerte Ausschnitte der jeweiligen Autoradiogramme der GeneFilters[®] Microarrays. Der Pfeil deutet auf eine differentiell transkribierte mRNA, der *PCL5* mRNA.

Um mögliche Zielgene zu identifizieren, die die Rolle von Ash1p in der pseudohyphalen Differenzierung näher charakterisieren, wurden mRNAs aus Hefezellen isoliert, die zuvor in

dem Pseudohyphen-induzierendem Medium SLAD herangezogen wurden. Die Induktionsdauer betrug 4 Stunden bei 30°C. Die mRNAs wurden reverstranskribiert, ³³P markiert und mit den GeneFilters[®] Microarrays hybridisiert. Nach vier wiederholten Hybridisierungen betrug die Anzahl der deutlich erkennbaren differentiell regulierten Gene, im Mittel 319. Die Anzahl der hochregulierten Gene im *myo4Δ* Stamm entsprach im Durchschnitt der Anzahl der runterregulierten Gene. Das Gen *PCL5*, das für ein Cyclin codiert, ist eines der Gene, dessen Expressionslevel in einer *myo4* Mutante signifikant niedriger ist als in einer *myo4/ash1* Doppelmutante (Abb.2.6).

2.4 Myo4p hat Einfluß auf die Expression der *PCL5* mRNA unter Nahrungsmangel

PCL5 ist ein Mitglied der Pcl1,2 Unterfamilie und Partner der Cyclin-abhängigen Kinase Pho85. Typischerweise sind Pho85-Cycline in Signaltransduktionswege, die auf Veränderungen in der extrazellulären Umgebung antworten, involviert (Carroll and O'Shea 2002). Ein Mangel an Aminosäuren und Purinen führt zu einer erhöhten Translationsrate des generellen Transkriptionsfaktor Gcn4p. Gcn4p wird bei Aminosäuremangel außerdem stabilisiert. Pho85p/Pcl5p phosphoryliert Gcn4p und ist somit für dessen Degradation verantwortlich. Gcn4p wiederum aktiviert die Transkription von *PCL5* und ist infolgedessen für seinen eigenen Abbau verantwortlich (Shemer, Meimoun et al. 2002).

In folgendem Experiment sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Mutation im *MYO4* Gen auf die Expression des Cyclins *PCL5* hat und welche Rolle *ASH1* in diesem Zusammenhang spielt. Da bislang für Pcl5p noch kein Zusammenhang in pseudohyphalen Differenzierungsprozessen nachgewiesen werden konnte, wurde zudem untersucht, ob der Effekt spezifisch für Stickstoffmangel ist oder sich allgemein auf das Hungern der Zellen bezieht. Hierzu wurden Hefezellen zunächst bis zu einer OD₆₀₀ von 1 mit ausreichend Nährstoffen (YEPD) versorgt, anschließend filtriert und entweder in Pseudohyphen-induzierendem Medium (SLAD) oder Minimalmedium aufgenommen und bei 30°C inkubiert. Den Medien wurden nur die für die jeweiligen Stämme essentiellen Aminosäuren zugefügt. Dieses Experiment wurde ebenfalls mit Stämmen durchgeführt, die mit leeren Vektoren transformiert waren, die aber die Versorgung mit den essentiellen Aminosäuren gewährleisten. (Die Daten hierzu waren identisch mit den folgenden Daten und werden aus diesem Grund nicht gezeigt.)

Für eine Northernblot-Analyse wurde die RNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Überführung in SLAD bzw. Minimal-Medium aus den Zellen extrahiert (Abb.2.7). Um die relative Menge an *PCL5* mRNA zu ermitteln, wurde ein Northernblot mit einer *PCL5* Sonde und einer *PDA1* Sonde durchgeführt und anschließend das Verhältnis *PCL5*/*PDA1* errechnet (Abb.2.8). *PDA1* codiert für eine Pyruvat-Dehydrogenase, die unter den gegebenen Bedingungen einen konstanten Transkriptionslevel beibehält und aus diesem Grund als Kontrolle zur Quantifizierung dient. Es konnte gezeigt werden, daß eine Mutation in *MYO4* oder *ASH1* keinen Einfluss auf die Expression des Cyclins *PCL5* hat, solange die Zellen ausreichend mit Nährstoffen versorgt sind. Nach einer Stunde Stickstoffmangel erhöht sich die *PCL5*-Expression in Wildtypzellen, welche sich nach ca. 4 Stunden auf einen konstanten Wert einpendelt und auch nach 12h Wachstum in SLAD-Medium unverändert bleibt (Daten nicht gezeigt). Hefezellen, die eine Deletion in *MYO4* besitzen, zeigen nur eine geringfügige Erhöhung des Expressionlevels von *PCL5* nach einer Stunde Inkubation in SLAD-Medium. Ein *ash1Δ* Stamm zeigt ein charakteristisches Wildtyp-Expressionsmuster. Deletiert man in einem *myo4Δ* Stamm zusätzlich das *ASH1*-Gen so gewinnt dieser das typische Expressionsmuster der Wildtyps zurück. Dies läßt darauf schließen, daß der Effekt einer *myo4* Mutation auf die *PCL5* Expression möglicherweise mit der Verteilung des Transkriptionsfaktors Ash1p zusammenhängt.

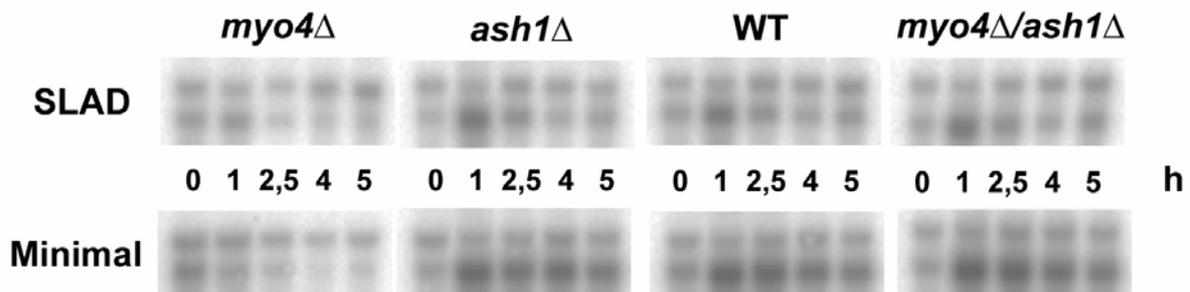


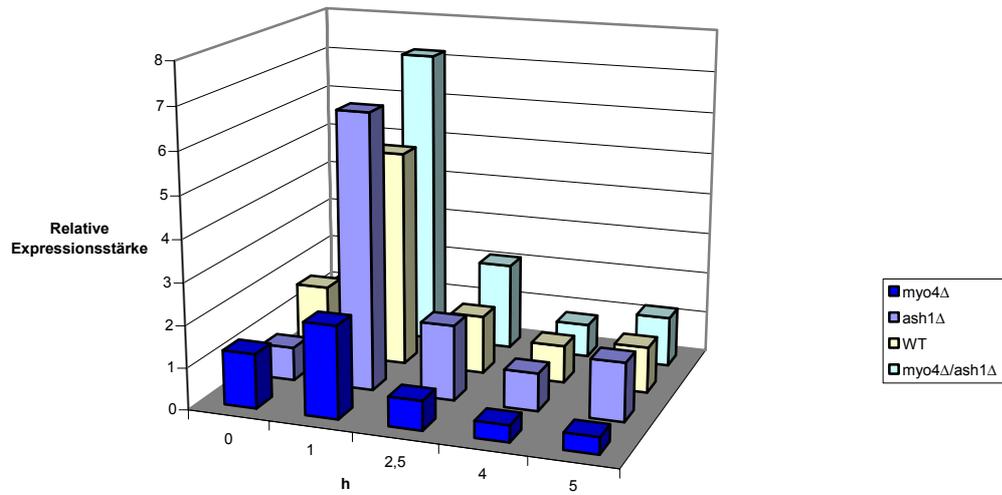
Abb. 2-7 Myo4p hat einen Einfluß auf das Expressionslevel von *PCL5*. Aus einem *myo4Δ*, einem *ash1Δ*, einem *myo4Δ/ash1Δ* und einem Wildtyp (WT) Stamm wurde RNA nach 0 (entspricht: Wachstum in YEPD); 1; 2,5; 4; und 5h Inkubation in SLAD bzw. Minimal-Medium isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einer ³²P-markierten *PDA1*-Sonde (obere Bande) und einer ³²P-markierten *PCL5*-Sonde (untere Bande) hybridisiert und mit dem Phosphorimager analysiert.

Der Effekt, daß eine *myo4* Deletion zu einem niedrigeren *PCL5*-Expressionslevel führt, ist deutlicher unter Aminosäurenmangel als unter Stickstoffmangel (Abb.2.8). Ein *myo4Δ* Stamm

ist unter Aminosäurenmangel nicht in der Lage wie ein Wildtyp-Stamm die *PCL5* Expression zu erhöhen. Auch hier könnte ein möglicher Grund die symmetrische Verteilung von Ash1p sein. Ein *ash1Δ* Stamm zeigt das gleiche Expressionsmuster wie ein Wildtyp-Stamm. Zudem erlangt auch unter Aminosäurenmangel ein *myo4Δ* Stamm mit zusätzlicher *ash1* Deletion den charakteristischen Wildtyp Expressionslevel von *PCL5*.

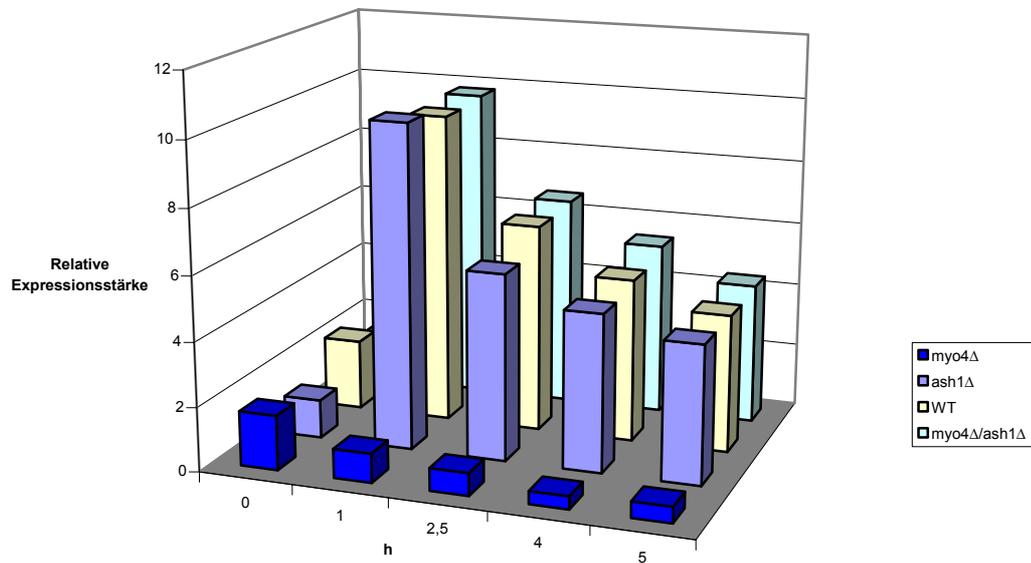
Das Myosin Myo4p ist in der Regulation des Cyclins *PCL5* unter Nahrungsmangel involviert. Transportiert Myo4p einen Regulationsfaktor? Garantiert Myo4p eine notwendige Asymmetrie oder einen erforderlichen Schwellenwert eines Transkriptionsfaktors?

SLAD



	0	1	2,5	4	5
myo4Δ	1,3	2,2	0,7	0,4	0,4
ash1Δ	0,8	6,6	1,8	0,9	1,4
WT	1,7	5,2	1,4	0,9	1,1
myo4Δ/ash1Δ	1,2	7,2	2,1	0,8	1,2

Minimal



	0	1	2,5	4	5
myo4Δ	1,7	0,9	0,7	0,4	0,5
ash1Δ	1,2	10,1	5,8	4,9	4,3
WT	2,2	9,7	6,5	5,1	4,3
myo4Δ/ash1Δ	1,5	9,8	6,6	5,4	4,4

Abb. 2-8 Relative Expressionsstärke der *PCL5* mRNA. Die Intensität der mRNA Signale aus Abb.2.7 wurde mit Hilfe des Phosphorimager ermittelt. Die Tabellen zeigen die Werte des Verhältnisses *PCL5*/*PDA1* und spiegeln die relative Menge an *PCL5* mRNA eines einzelnen repräsentativen Northernblots (Abb.2.7) wider.

2.5 Die Myo4p-abhängige Regulation der *PCL5* Expression ist diploid-spezifisch

Mit der folgenden Northernblot-Analyse sollte untersucht werden, ob die Myo4p-abhängige Regulation der *PCL5* Expression Ploidie-abhängig ist. Filamentöse Differenzierungsprozesse sind in haploiden Hefezellen limitierter, obgleich die Signaltransduktionswege, die den Dimorphismus hervorrufen, die gleichen sind (Gancedo 2001). Zellen mit unterschiedlicher Ploidie zeigen für gewöhnlich Unterschiede in ihrer Entwicklung, Morphologie und Physiologie. Welche Gene für die Ploidie-abhängigen Merkmale möglicherweise verantwortlich sind, konnte von Galitski et al. durch Microarray-Analysen ermittelt werden (Galitski, Saldanha et al. 1999). 17 Gene waren Ploidie-spezifisch reguliert, darunter unter anderem die G1-Cycline Cln1 und Pcl1 und das für den Dimorphismus essentielle Zelloberflächenprotein Flo11.

Um eine mögliche Ploidie-Abhängigkeit der *PCL5*-Expression zu untersuchen, wurden haploide Wildtyp und *myo4Δ* Hefezellen in Vollmedium (YEED) bis zu einer OD₆₀₀ von 1 herangewachsen und eine Probe zur RNA-Extraktion entnommen. Die Zellen wurden in Minimalmedium überführt und nach 1, 2,5 und 4 Stunden wurden Proben für die Northernblotanalyse entnommen (Abb.2.9). Hybridisiert wurde mit einer ³²P-markierten *PCL5* und einer *PDA1*-Sonde. Die Quantifizierung der *PCL5* mRNA geschah mittels Phosphorimager und ergab, daß die Expression des Cyclins Pcl5 in haploiden Hefezellen unabhängig vom Nahrungsangebot ist. Eine Deletion in *MYO4* ändert das konstante Expressionlevel von *PCL5* in haploiden Zellen nicht. Die *MYO4*-abhängige Expressionsregulation von *PCL5* ist diploidspezifisch und abhängig vom Nahrungsangebot in der Umgebung der Hefezelle.

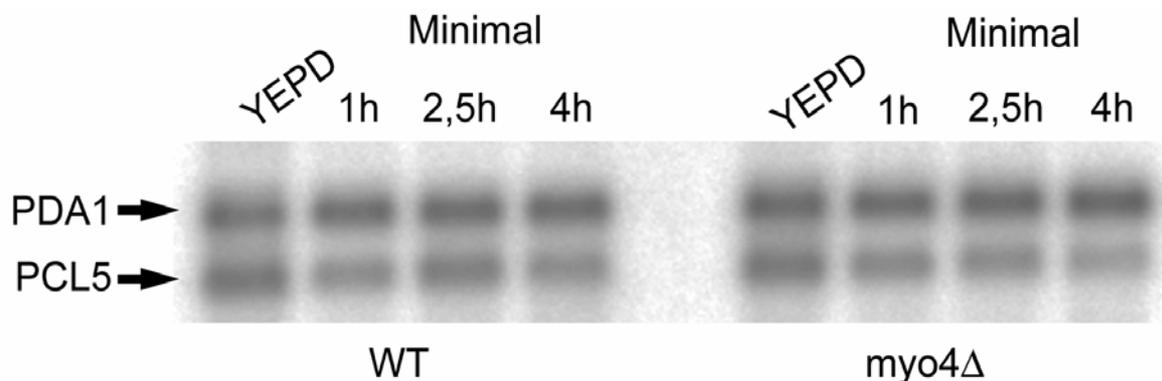


Abb. 2-9 *MYO4* reguliert die *PCL5* Expression diploidspezifisch. Aus haploiden Wildtyp (WT) und *myo4Δ* Zellen wurde nach Wachstum in YEED und nach 1, 2,5 und 4h Inkubation in Minimal-Medium RNA isoliert und eine Northernblot-Analyse durchgeführt. Die *PCL5*/*PDA1* Verhältnisse sind aus Tabelle 2.2 zu entnehmen.

	YEPD	1h	2,5h	4h
WT	1,0	0,5	0,6	0,5
<i>myo4</i> Δ	0,7	0,5	0,4	0,3

Tab.2.2 Quantifizierung der *PCL5* mRNA in haploiden *S.cerevisiae* Zellen. Die relative Menge der *PCL5* mRNA wurde über das Verhältnis PCL5/PDA1 ermittelt.

2.6 *MYO4* reguliert die Transkription eines *PCL5* Promotor-Luziferase Reporters diploid-spezifisch

Eine Differenz der *PCL5* mRNA Expressionsstärke, wie sie durch die Northernblot-Analyse sichtbar gemacht wurde, kann zum einen durch eine Veränderung der mRNA Stabilität verursacht werden oder zum anderen durch Änderungen in der Transkriptionsaktivierung des betreffenden Gens. Um herauszufinden, was die Ursache der niedrigeren *PCL5* mRNA Expressionsstärke in diploiden *myo4* Mutanten ist, wurde zunächst der Promotor des *PCL5* Gens mit dem Luziferase-Gen fusioniert (Gossen and Bujard 1992). Dieses Reportersystem wurde in haploide und diploide Wildtyp *Saccharomyces cerevisiae* Zellen und *myo4* Mutanten transformiert. Die Transkriptionsaktivität des artifiziellen *PCL5*-Promotor-Luziferase Gens wurde im Bioluminometer gemessen und als relative Lichteinheiten (RLU) angegeben (Abb.2.10).

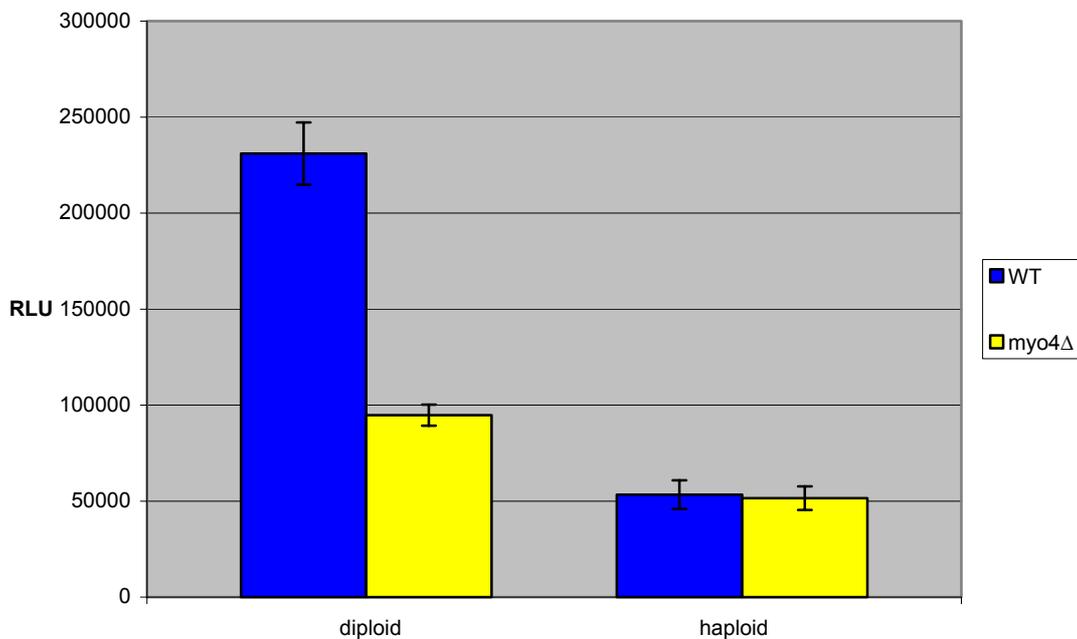


Abb. 2-10 Der Effekt einer *myo4* Deletion auf die Transkriptionsaktivität des *PCL5*-Promotor-Luziferase Reportersystems. Die Aktivität wurde im Bioluminometer gemessen und als relative Lichteinheit (RLU) angegeben.

Die quantitative Messung der Transkriptionsaktivität zeigt eine deutlich verminderte Aktivität der Transkription des *PCL5*-Promotor-Luziferase Reportersystems in einem diploiden *myo4Δ* Stamm im Vergleich zu einem diploiden Wildtyp Stamm. Wie auch schon durch die Northernblot-Analyse gezeigt wurde, zeigen haploide Hefezellen keine Differenz in der Transkriptionsaktivität des *PCL5*-Promotor-Luziferase Reportersystems. *MYO4* ist also in die diploidspezifische transkriptionelle Aktivierung des Cyclins Pcl5 involviert.

2.7 Der Effekt einer *ASH1* Überexpression auf die *PCL5* Expression

Es konnte gezeigt werden, daß die Deletion des Transkriptionsfaktor *ASH1* keinen Einfluß auf den mRNA Level von *PCL5* hat. Jedoch zeigt eine Doppelmutante *myo4Δ/ash1Δ* im Vergleich zu Hefezellen, die nur eine Mutation in *MYO4* besitzen wieder die gleiche Expressionstärke der *PCL5* mRNA wie Wildtypzellen. Eine *ash1* Mutation hebt also den Effekt auf, den eine *myo4*- Deletion auf die *PCL5* Transkription ausübt.

Ist die Myo4-assoziierte RNA-Transportmaschinerie nicht funktionell, wird *ASH1* mRNA nicht mehr an die Spitze der Tochterzelle lokalisiert und folglich ist Ash1p symmetrisch auf die Zellkerne der Mutter und Tochter verteilt. Das Zielgen *HO* wird somit auch in der Mutter reprimiert. Eine symmetrische Verteilung von Ash1p wird auch durch die Überexpression von *ASH1* erzeugt.

Wenn die Aufhebung der Asymmetrie der Grund für die Änderung der *PCL5*-Transkriptionsaktivität ist, dann sollte diese auch in weiteren *she* Mutanten und bei *ASH1* Überexpression herabgesenkt sein.

Die Northernblot-Analyse einer *she2Δ* Mutante und eines Wildtypstammes, der *ASH1* überexprimiert sollte diese Frage beantworten. Leider war es mir nicht möglich ein weiteres *SHE*-Gen (*SHE3*) in dem gewünschten Sigma-Stamm zu deletieren.

Eine Überexpression von *ASH1* zeigt nach Inkubation in Minimal-Medium eine Herabsenkung des *PCL5* mRNA Levels (Abb.2.11). Eine Deletion des *SHE2* Gens wirkt sich nicht auf die Transkriptionsaktivität von *PCL5* aus. Der *PCL5* mRNA Level unter Nahrungsmangel entspricht in einer *she2* Mutante dem eines Wildtyp-Stammes (Abb.2.11).

Abb.2.12 zeigt die *PCL5*/*PDA1* Verhältnisse. Hier ist deutlich zu erkennen, daß sich eine *ASH1*-Überexpression in einem Wildtypstamm auf die Expressionsstärke der *PCL5* mRNA, ähnlich wie eine *myo4* Deletion auswirkt.

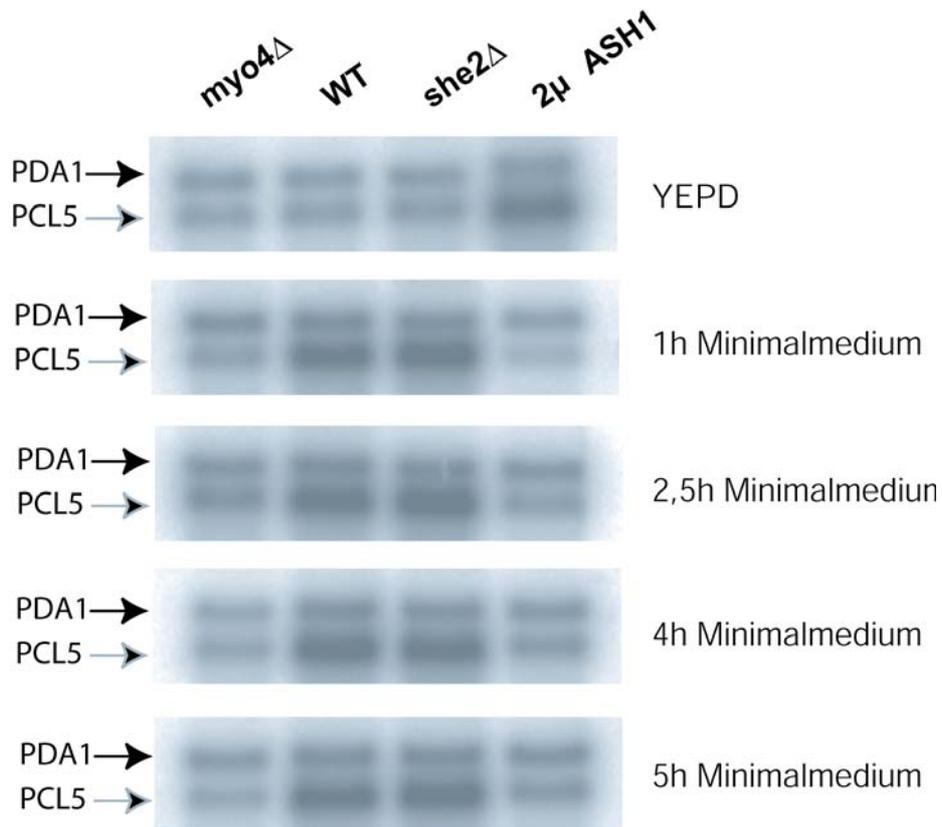
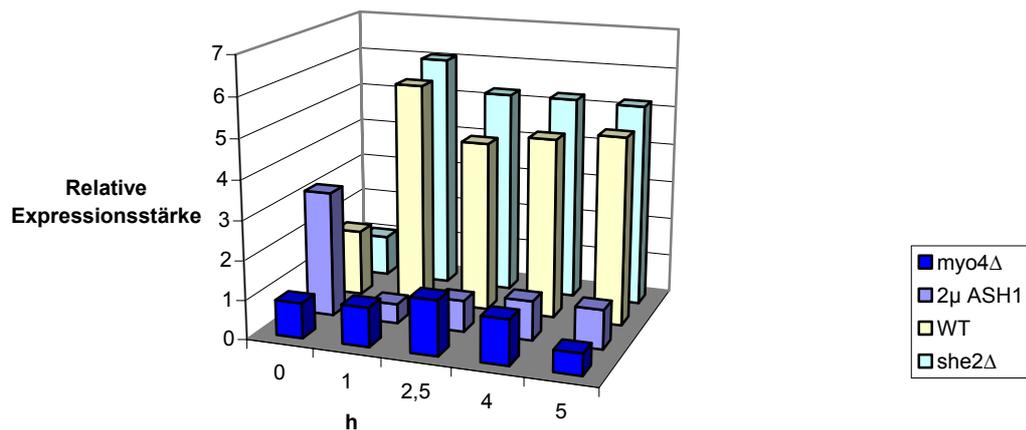


Abb. 2-11 Der Effekt von *she2Δ* und 2μ *ASH1* auf die *PCL5* Transkription. Eine Northernblot-Analyse wurde mit RNA aus einem WT, *myo4Δ*, *she2Δ* und 2μ *ASH1* Stamm nach Wachstum in Vollmedium und 1; 2,5; 4 und 5h Wachstum in Minimal-Medium durchgeführt. Der Northernblot wurde mit 32 P markierten PDA1 und PCL5 Sonden hybridisiert.



	0	1	2,5	4	5
■ myo4Δ	0,9	1	1,4	1,15	0,55
■ 2μASH1	3,2	0,5	0,8	1	1
■ WT	1,7	5,7	4,35	4,6	4,8
■ she2Δ	1,05	6,05	5,25	5,25	5,2

Abb. 2-12 Die relative *PCL5* mRNA Menge im Vergleich. Im Diagramm ist das *PCL5*/*PDA1* Verhältnis der verschiedenen Stämme(*myo4Δ*, 2μ *ASH1*, WT, *she2Δ*) gezeigt.

2.8 Morphologische Abnormalitäten einer *ash1/pcl5* Doppelmutante

Die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) *PHO85* ist ebenso wie ihre Cycline, nicht essentiell. Die Cycline, die mit Pho85 einen Komplex eingehen, sind durch Sequenzhomologien in zwei Unterfamilien eingeteilt: die Unterfamilien Pho80 (Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 und Pcl10) und Pcl1,2 (Pcl1, Pcl2, Clg1, Pcl5 und Pcl9). Eine *pho85* Deletion führt zu morphologischen Abnormalitäten, die in diploiden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ausgeprägter sind. Die Hefezellen sind groß, verlängert und besitzen erweiterte Verbindungsstellen zwischen Mutter- und Tochterzelle. Einen ähnlichen Phänotyp zeigen Zellen, deren komplette Pcl1,2 Unterfamilie deletiert wurde (Measday, Moore et al. 1997). Mutationen in den einzelnen Genen der Pcl1,2 Unterfamilie sind phänotypisch nicht auffällig. Auch Doppelmutanten mit Ausnahme eines *pcl5Δ/pcl9Δ* Stammes zeigen keine Auffälligkeiten. In einer Kultur von *pcl5Δ/pcl9Δ* Zellen kommt es zu einigen zusammenhängenden Zellketten.

Der Phänotyp eines *pcl1,2,4,9; clg1Δ* Stammes zeigt Charakteristiken diploider pseudohyphaler Zellen oder von Hefezellen, die Defekte in der Zytokinese oder Zellseparation besitzen. Ein ähnlicher Phänotyp bewirkt die Überexpression von *MYO4* (Haarer, Petzold et al. 1994). Eine Deletion oder Überexpression von *ASH1* ist in Vollmedium morphologisch unauffällig, sobald die Zellen jedoch unter Stickstoffmangel leiden sind *ash1Δ* Zellen nicht in der Lage sich zu Pseudohyphen zu differenzieren.

Eine phänotypische Analyse sollte Aufschluß über mögliche zusammenhängende Funktionen geben. Folgende haploide und homozygote, diploide Mutanten wurden hergestellt und mikroskopisch untersucht: *pcl5Δ*, *pcl1Δ*, *myo4Δ/pcl5Δ*, *ash1Δ/pcl5Δ*, *ash1Δ/pcl1Δ*, *ash1Δ/myo4Δ/pcl5Δ*. Morphologische Abnormalitäten zeigte nur der haploide und diploide *ash1Δ/pcl5Δ* Stamm (Abb.2.13). Die Zellen sind größer, verlängert und bilden zusammenhängende Ketten aus, ähnlich dem Phänotyp eines Stammes, der Deletionen in der kompletten Pcl1,2 Unterfamilie besitzt. Ein *ash1Δ/pcl1Δ* Stamm kann diese Abnormalitäten in seiner Morphologie nicht aufweisen. Durch die Expression des *ASH1* oder des *PCL5* Gens von einem 2 μ -Plasmid erlangt der *ash1Δ/pcl5Δ* Stamm wieder die Morphologie des Wildtyps bzw. der jeweiligen Einzelmutation, die sich vom Wildtyp nicht unterscheidet.

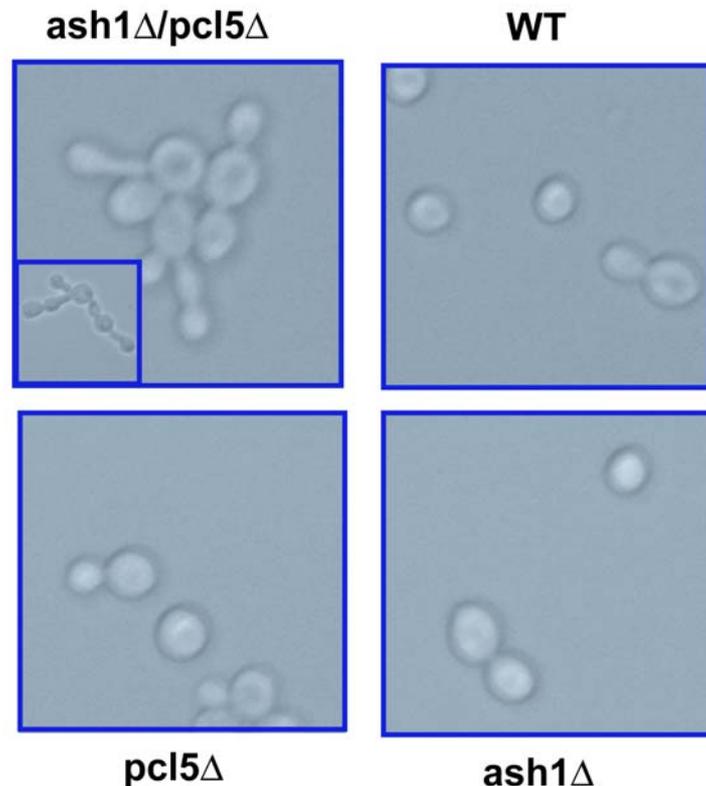


Abb. 2-13 Die Morphologie eines *ash1Δ/pc15Δ* Stammes. DIC-Aufnahmen von Wildtyp (WT), *ash1*, *pc15Δ* und *ash1Δ/pc15Δ* Zellen. (Rechteck links unten in *ash1Δ/pc15Δ*: zusätzliche 1:5 Verkleinerung einer Kette von *ash1Δ/pc15Δ* Zellen)

2.9 Das Knospungsverhalten der *ash1/pc15* Doppelmutante

Das Knospungsverhalten haploider *Saccharomyces cerevisiae* Zellen unterscheidet sich von dem diploider Hefezellen. Eine haploide Zelle neigt zu einem unipolaren, axialen Knospungsverhalten, während eine diploide Zelle sich nach einem bipolaren Muster teilt. Kurz bevor sich eine Knospe ausbildet, formiert sich in der Zellwand der Hefezelle ein Chitinring. Die Knospe bildet sich innerhalb dieses Chitinringes, der erhalten bleibt bis sich die Knospe abschnürt und als Bildungs- bzw. Entstehungsnarbe auf den Zellen zurückbleibt. Chitinreiche Strukturen in der Zellwand der Hefe können mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Calcofluor gefärbt werden. Bei einer Überexpression des Myosin *MYO4* ist die Chitin-Lokalisation in den Zellen abnormal (Haarer, Petzold et al. 1994). Um zu überprüfen ob dies auch auf die *ash1Δ/pc15Δ* Mutanten zutrifft, wurden diese mit Calcofluor gefärbt. In Abbildung 2.14 ist zu sehen, daß haploide *ash1Δ* und *pc15Δ* Zellen nach einem axialen Muster knospen und diploide *ash1Δ* und *pc15Δ* Zellen nach einem bipolaren Muster. Die Chitin-

Lokalisation unterscheidet sich nicht von der Chitin-Verteilung der Wildtypzellen. In den haploiden sowie den diploiden *ash1Δ/pcl5Δ* Zellen ist eine zufällige Chitin-Lokalisation zu erkennen. Die Mislokalisierung des Chitins ist eine Ursache für die abnormale Morphologie und für das Misslingen der vollständigen Zytokinese der *ash1Δ/pcl5Δ* Zellen.

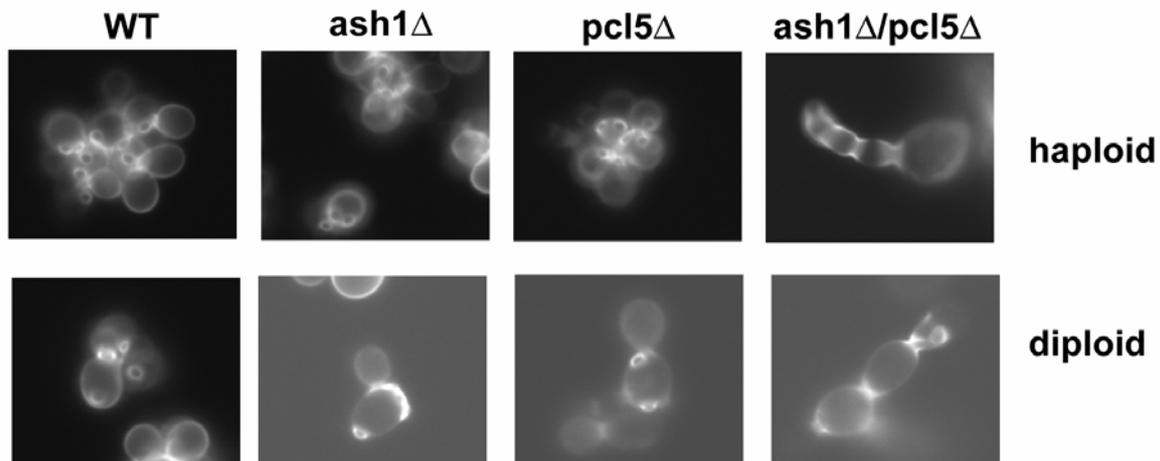


Abb. 2-14 Knospungsmuster und Chitin-Lokalisation der *ash1*, *pcl5* und *ash1/pcl5* Deletionsstämme. Logarithmisch wachsende Hefezellen wurden mit Calcofluor gefärbt und mikroskopisch analysiert. Die Bildungsarben der Wildtyp (WT), *ash1Δ* und *pcl5Δ* Zellen zeigen das für haploide Hefezellen typische axiale Knospungsmuster und das für diploide Hefezellen charakteristische bipolare Knospungsmuster. Diese Knospungsmuster sind in *ash1Δ/pcl5Δ* Zellen nicht mehr vorhanden.

2.10 Die Organisation des Aktinzytoskeletts ist gestört in einer *ash1/pcl5* Doppelmutante

Die Segregation in zwei nicht identische Zellen wie im Falle von Mutter- und Tochterzelle in *Saccharomyces cerevisiae* setzt eine vorhergehende Polarisation des Aktinzytoskeletts voraus. Sekretorische Vesikel, Organellen und Faktoren, die die unterschiedlichen Schicksale der Zellen gewährleisten, müssen in Richtung polarisiertes Wachstum geliefert werden. Eine gerichtete Anordnung von Aktinkabeln am Zellkortex ist die primäre strukturelle Determinante dieser Polarität. Motorproteine liefern ihre Fracht entlang der Kabel in die Wachstumsrichtung bzw. die Tochterknospe. Kortikale Aktin-patches verstärken und erhalten diese Polarität (Pruyne and Bretscher 2000).

Eine Misorganisation des Aktinzytoskeletts in *ash1Δ/pcl5Δ* Mutanten, die offensichtlich Störungen in Zellvorgängen wie polarisiertes Wachstum, Zytokinese und Zellseparation

aufweisen, ist denkbar. Um dies zu überprüfen wurden die Aktinfilamente mit Alexa-Fluor-488 gekoppeltem Phalloidin angefärbt (Abb.2.15). Das gefärbte Aktinzytoskelett von Wildtyp, *ash1Δ*, *pcl5Δ* und *ash1Δ/pcl5Δ* Zellen wurde im FITC-Kanal analysiert. Die *ash1* und *pcl5* Mutanten zeigen genauso wie Wildtypzellen Aktin-*patches*, die in der Tochterzelle akkumulieren und Kabelstrukturen, die sich von der Mutterzelle in Richtung Knospenspitze orientieren. In der *ash1/pcl5* Doppelmutante sind keine Aktinkabel-Strukturen mehr zu erkennen. Aktinkabel sind jedoch essentiell für die Lebensfähigkeit der Hefezellen. Möglicherweise organisieren sich die Aktinfilamente in sehr feine im Mikroskop nicht erkennbare Kabel oder gebrochene Kabel wie dies der Fall in *tpm1Δ* und *cap2Δ* Mutanten ist (Pruyne and Bretscher 2000). Die Aktinpatches, die unter anderem notwendig sind für die Regulation des Zellwandaufbaus, akkumulieren in *ash1Δ/pcl5Δ* Zellen nur noch teilweise in der Knospenspitze.

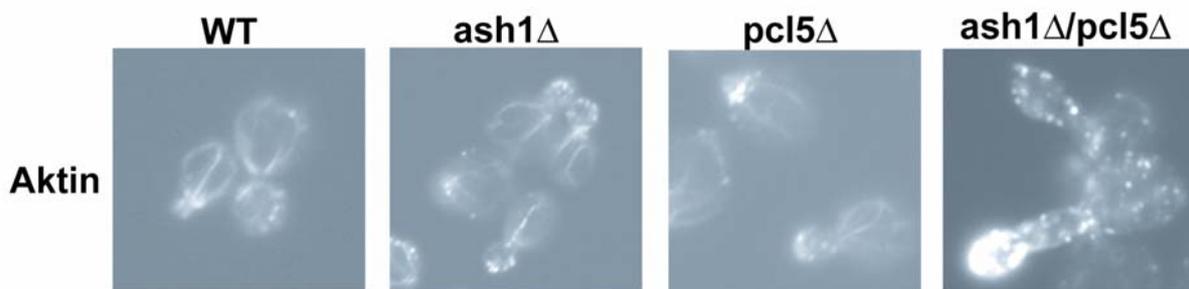


Abb. 2-15 Aktinlokalisierung in *ash1Δ*, *pcl5Δ* und *ash1Δ/pcl5Δ* Deletionsstämmen. Die Aktinstrukturen wurden mit Alexa Fluor 488 gekoppeltem Phalloidin angefärbt und im FITC Kanal sichtbar gemacht.

2.11 In einem hungernden *myo4Δ* Stamm akkumulieren Zellen, die G1 überschritten haben

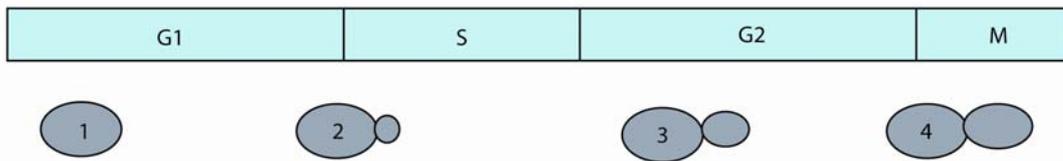
Saccharomyces cerevisiae Zellen, die unter limitierten Nährstoffen überleben müssen erfahren eine Verzögerung in ihrem Zellzyklus. Die G1-Phase des Zellzyklus ist unter Nahrungsmangel verlängert. Post-START Zellen, Hefezellen die den Restriktionspunkt START überschritten haben, vollenden den Zellzyklus jedoch auch wenn sie hungern.

Eine Mutation im Myosin *MYO4* hat einen Effekt auf die Transkription eines Cyclins, welches Zellzyklus-spezifisch reguliert wird. *PCL5* besitzt sein Transkriptionsmaximum in

der G1-Phase des Zellzyklus. Hat eine *myo4* Deletion möglicherweise Einfluß auf den Zellzyklus der Hefe?

Eine statistische Auswertung einer logarithmisch wachsenden Kultur sollte einen Hinweis darauf geben. Hierzu wurden Zellen gezählt, die sich in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden. Eine Wildtyp-Kultur wurde mit einer *myo4Δ*-Kultur verglichen (Abb.2.16). Es wurde jeweils die Anzahl der Zellen ermittelt, die sich in G1 befinden (1), die am Beginn der Knospung stehen (2), die sich in G2 befinden (3) und solche, die kurz vor ihrer Cytokinese stehen (4). Solange den Wildtyp und *myo4Δ* Hefezellen ausreichend Nahrung (YEED) zur Verfügung steht, ist keine signifikante Differenz im prozentualen Anteil der Zellen in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus zu erkennen. Sobald die Hefezellen hungern, steigt in Wildtyp-Zellen die Anzahl an G1-Zellen. In *myo4Δ* Zellen erhöht sich die Zahl an Zellen, die in die S-Phase übergegangen sind. 43% der Zellen, die eine Mutation im *MYO4*-Gen besitzen, befinden sich nach einer Stunde Mangelernährung am Anfang der Knospung während nur 18% der Wildtypzellen beginnen sich zu knospen. Diese Tendenz wird auch noch nach 4h beibehalten. Eine Verzögerung der G1-Phase bei Nahrungsmangel, wie sie in Wildtyp-Zellen deutlich wird ist in einem *myo4Δ* Stamm nicht zu beobachten. Der prozentuale Anteil der G1-Zellen unter Nahrungsmangel erhöht sich in einer Wildtyp-Kultur von 15% auf bis zu 28%. In einer *myo4Δ*-Kultur bleibt der Anteil konstant bei 11-12%.

Wird ein *myo4* Deletionsstamm mit einem Plasmid, welches das *MYO4*-Gen exprimiert transformiert, verhalten sich die Hefezellen wieder wie Wildtypzellen. Ein Plasmid, daß ein *MYO4*-frameshift Allel exprimiert erzielt kein Wildtypverhalten (Daten nicht gezeigt).



	WT	myo4Δ	WT	myo4Δ	WT	myo4Δ	WT	myo4Δ
YEPD	15%	11%	21%	28%	35%	35%	30%	27%
	± 13,9	± 6,9	± 5,6	± 9,1	± 2,1	± 5,7	± 9,2	± 2,1
1h								
Minimal	25%	11%	18%	43%	37%	30%	21%	17%
	± 2,6	± 4,9	± 2,1	± 6,7	± 4	± 4	± 3,6	± 7
2,5h								
Minimal	27%	11%	17%	44%	29%	30%	26%	11%
	± 4,4	± 2,1	± 1	± 1	± 7	± 3,5	± 10	± 2,6
4h								
Minimal	28%	12%	21%	47%	34%	31%	17%	10%
	± 6,4	± 0,6	± 3,6	± 2,5	± 2,6	± 2,1	± 4,4	± 3
		1		2		3		4

Abb. 2-16 Prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Zellzyklusstadien in logarithmisch wachsenden Wildtyp (WT) und *myo4Δ* Kulturen. 1: G1-Zellen, 2: Zellen mit kleiner Knospe, 3: G2-Zellen, 4: Zellen, kurz vor der Cytokinese. Die Zellen wurden jeweils nach Wachstum in Vollmedium (YEPD) und nach 1; 2,5 und 4h Wachstum in Minimalmedium gezählt. Standardabweichung (±) in Prozent.

2.12 Die Expression von *CLN2* und *PCL1* ist unverändert in hungernden *myo4Δ* Zellen

Der in G1 gebildete Cdc28/Cln3 Komplex stimuliert die Transkription der Cycline *CLN1* und *CLN2*. Nach einem Anstieg der Konzentration von Cln1p und Cln2p bilden diese Proteine mit Cdc28 Komplexe, die das Überschreiten des START-Punktes und das Einsetzen der S-Phase fördern. Der Cdc28/Cln2 Komplex erreicht sein Aktivitätsmaximum kurz nach Überschreiten des START-Punktes. Cln1 und Cln2 aktivieren nach ihrer Expression über einen Transkriptionsfaktor ihre eigene Expression. Wir wollten wissen, ob ein *myo4*

Deletionsstamm nicht nur morphologisch im hungernden Zustand vermehrt Zellen ansammelt, die sich unmittelbar am Einsetzen der S-Phase befinden, sondern ob dieser Zustand auch auf der Basis der Genexpression des *CLN2* Gens nachgewiesen werden kann. Die Expressionsstärke von *CLN2* aus Zellen, die unter Nahrungsmangel leiden wurde mittels eines Northernblots analysiert. Nach 2,5h Wachstum in Minimalmedium ist ein deutlicher Rückgang der *CLN2* Expression in Wildtypzellen zu erkennen, während die relative *CLN2* mRNA Menge in einem *myo4Δ* Stamm unverändert bleibt (Abb.2.17). Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, daß sich in einem hungernden *myo4Δ* Stamm Zellen ansammeln, welche am Beginn der Knospung stehen.

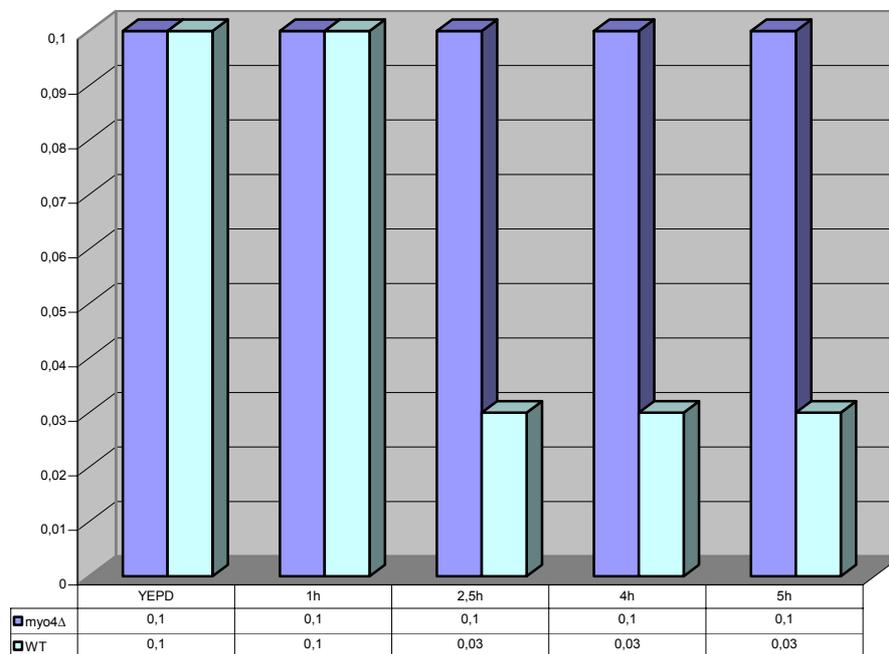


Abb. 2-17 Die Expression des *CLN2* Gens ist in einem *myo4Δ* unter Nahrungsmangel unverändert. Die RNA aus Wildtyp und *myo4Δ* Zellen wurde jeweils nach Wachstum in Vollmedium (YEPD) und nach 1; 2,5; 4 und 5h Wachstum in Minimalmedium isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *CLN2* Sonde hybridisiert. Anschließend wurde das *CLN2*/*PDA1* Verhältnis ermittelt.

Das Pho85-Cyclin *PCL1* wird ebenfalls zellzyklusspezifisch reguliert und zeigt ein dem *CLN2* ähnliches Transkriptionsprofil. Aus diesem Grund wurde mit der isolierten RNA aus den Wildtyp und *myo4Δ* Zellen, in Voll- bzw. Mangelmedium eine Northernblot-Analyse mit einer *PCL1*-Sonde durchgeführt (Abb.2.18). Zu erwarten wäre eine Abnahme der relativen *PCL1* mRNA Menge in einer hungernden Wildtyp-Kultur, da sich hier eine verzögerte G1-

Phase einstellt. Sofern *MYO4* nicht in der Expressionregulation von *PCL1* involviert ist, sollte die Expression durch eine Mutation in *MYO4* unverändert bleiben.

Eine Abnahme der *PCL1* mRNA Menge ist in Wildtypzellen nach 2,5h Wachstum in Minimalmedium zu beobachten. Eine leichte Reduktion der *PCL1* mRNA ist in *myo4Δ* Zellen erst nach 4h zu erkennen.

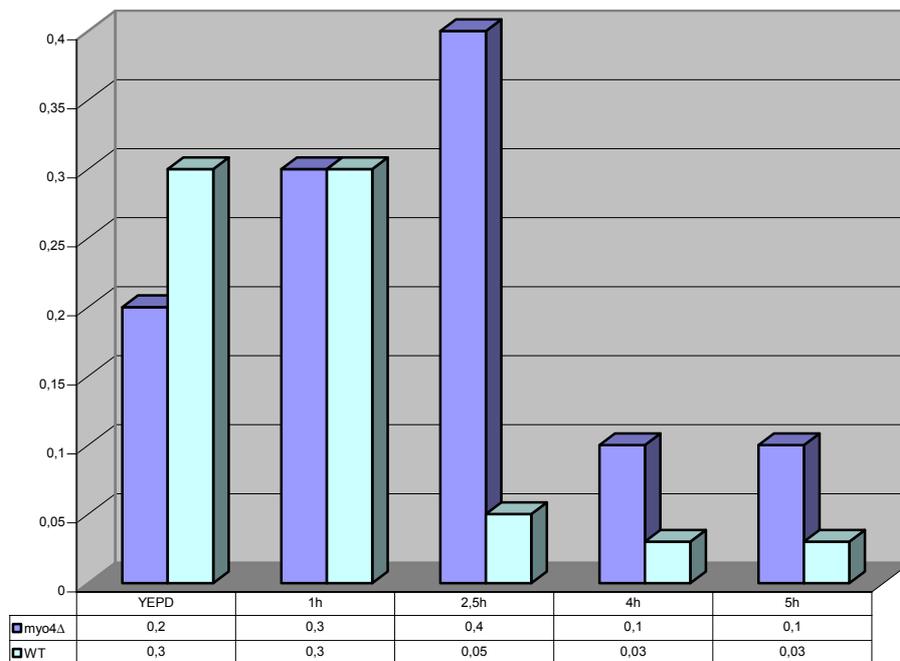


Abb. 2-18 Die Expression der *PCL1* mRNA in Wildtyp und *myo4Δ* Zellen unter Nahrungsmangel. Die RNA aus Wildtyp und *myo4Δ* Zellen wurde jeweils nach Wachstum in Vollmedium (YEPD) und nach 1; 2,5; 4 und 5h Wachstum in Minimalmedium isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer *PCL1* Sonde hybridisiert. Anschließend wurde das *PCL1*/*PDA1* Verhältnis ermittelt.

2.13 Die Teilungsrate eines hungernden *myo4Δ* Stammes ist erhöht

Das Wachstum einer *Saccharomyces cerevisiae* Flüssigkultur ist unterteilt in eine exponentielle Phase und in eine stationäre Phase. Die stationäre Phase wird erreicht, wenn essentielle Nährstoffe nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Die Zellen haben dann eine OD_{600} von mindestens 3 erreicht. Um zu testen, ob eine Mutation im *MYO4* Gen einen Einfluß auf die Teilungsrate der Hefe hat, wurde eine Wachstumskurve erstellt. Hierzu wurde zunächst ein Wildtyp und ein *myo4Δ* Stamm bis zu einer OD_{600} von ca. 0,8 in

Vollmedium hochgezogen und anschließend in Minimalmedium überführt. Die optische Dichte wurde stündlich gemessen.

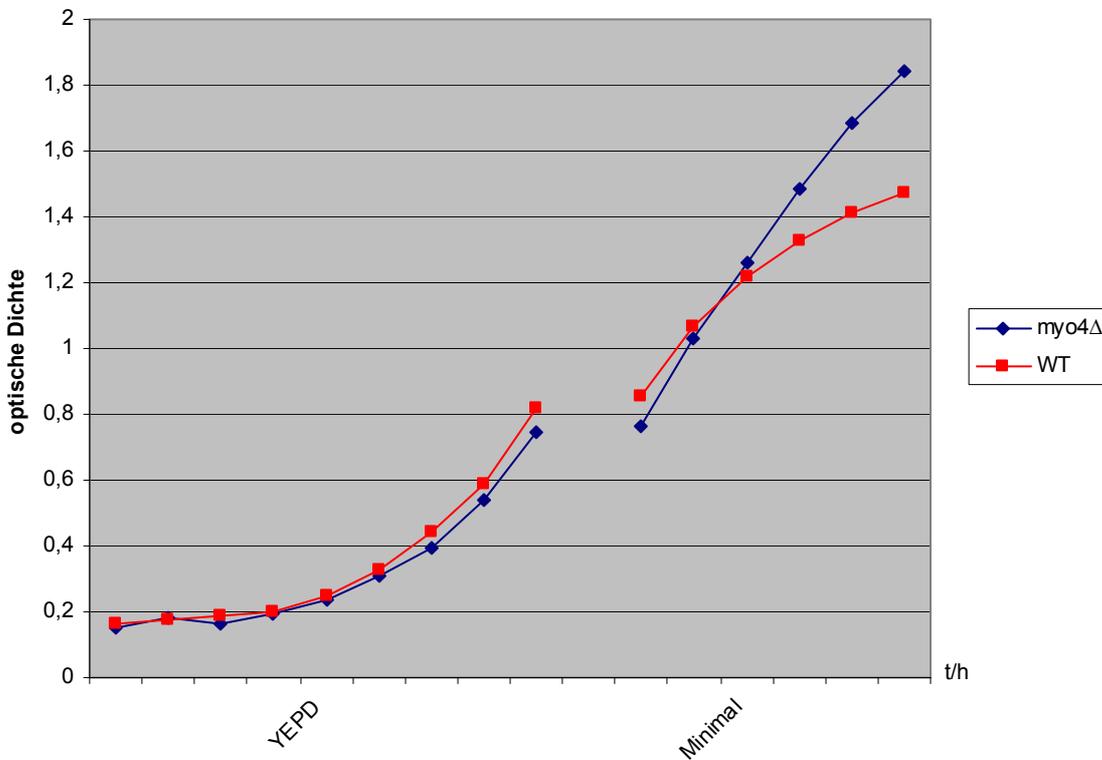


Abb. 2-19 Repräsentative Wachstumskurve eines *myo4Δ* Stammes im Vergleich zum Wildtyp (WT). Exponentiell wachsende Zellen wurden bei einer OD_{600} von ca. 0,8 in Minimalmedium überführt. Die Teilungsrate der Hefezellen wurde stündlich ermittelt.

Solange die Hefezellen mit ausreichend Nahrung versorgt werden, verhalten sich Wildtyp und *myo4Δ* Zellen in Bezug auf ihre Teilungsrate identisch (Abb.2.19, YEPD). Nach einer Überführung in Mangelmedium zeigt der *myo4* Deletionstamm eine erhöhte Teilungsrate im Vergleich zum Wildtypstamm (Abb.2.19, Minimal). Diese Wachstumsdifferenz von ca. 25% wird nur erreicht wenn die Hefen hungern. Überführt man die Zellen mit einer OD_{600} von ca. 0,8 in frisches YEPD-Medium ist kein Unterschied im weiteren Wachstum der Zellen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Wird in einem *myo4Δ* Stamm zusätzlich das *PCL5* oder *ASH1* Gen deletiert, wachsen die hungernden Doppelmutanten mit der gleichen Teilungsrate wie der Wildtyp (Abb.2.20). Einzelmutationen in den Genen *PCL5*, *ASH1* oder *SHE2* haben ebenfalls keinen Einfluß auf die Teilungsrate der Zellen unter Nahrungsmangel (Daten nicht gezeigt).

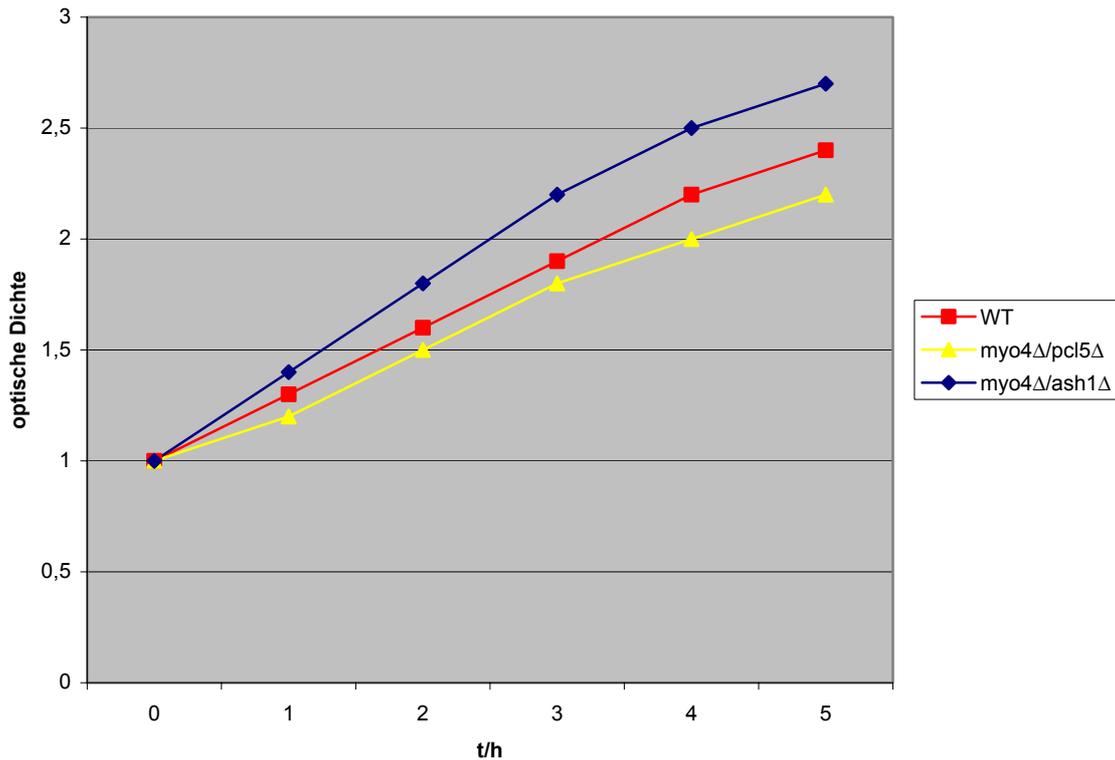


Abb. 2-20 Repräsentative Wachstumskurve der Doppelmutanten *myo4Δ/pcl5Δ* und *myo4Δ/ash1Δ* im Vergleich zum Wildtyp (WT). Exponentiell wachsende Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von ca.0,8 in Minimalmedium überführt. Die Teilungsrate der Hefezellen wurde stündlich ermittelt.

2.14 Die erhöhte Teilungsrate ist *ASH1*-abhängig

Der erste Hinweis, daß eine erhöhte Teilungsrate möglicherweise abhängig von *ASH1* ist, ist die Tatsache, daß die zusätzliche Mutation des *ASH1* Gens in einer *myo4* Mutante den Phänotyp derselbigen revertiert. In einer *myo4* Mutante ist Ash1p symmetrisch auf Mutter- und Tochterzellkern verteilt. Eine Aufhebung der Asymmetrie erzielt man auch durch eine Überexpression von *ASH1*.

Ist *ASH1* für die erhöhte Teilungsrate verantwortlich, so sollte die Überexpression des *ASH1* Gens von einem 2 μ -Plasmid ebenso in einer erhöhten Teilungsrate resultieren.

Nachdem die Stämme (WT, *myo4Δ*, WT + 2 μ *ASH1*) jeweils bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 in Vollmedium herangezogen wurden, wurden sie in Minimalmedium überführt. Die optische Dichte wurde stündlich gemessen.

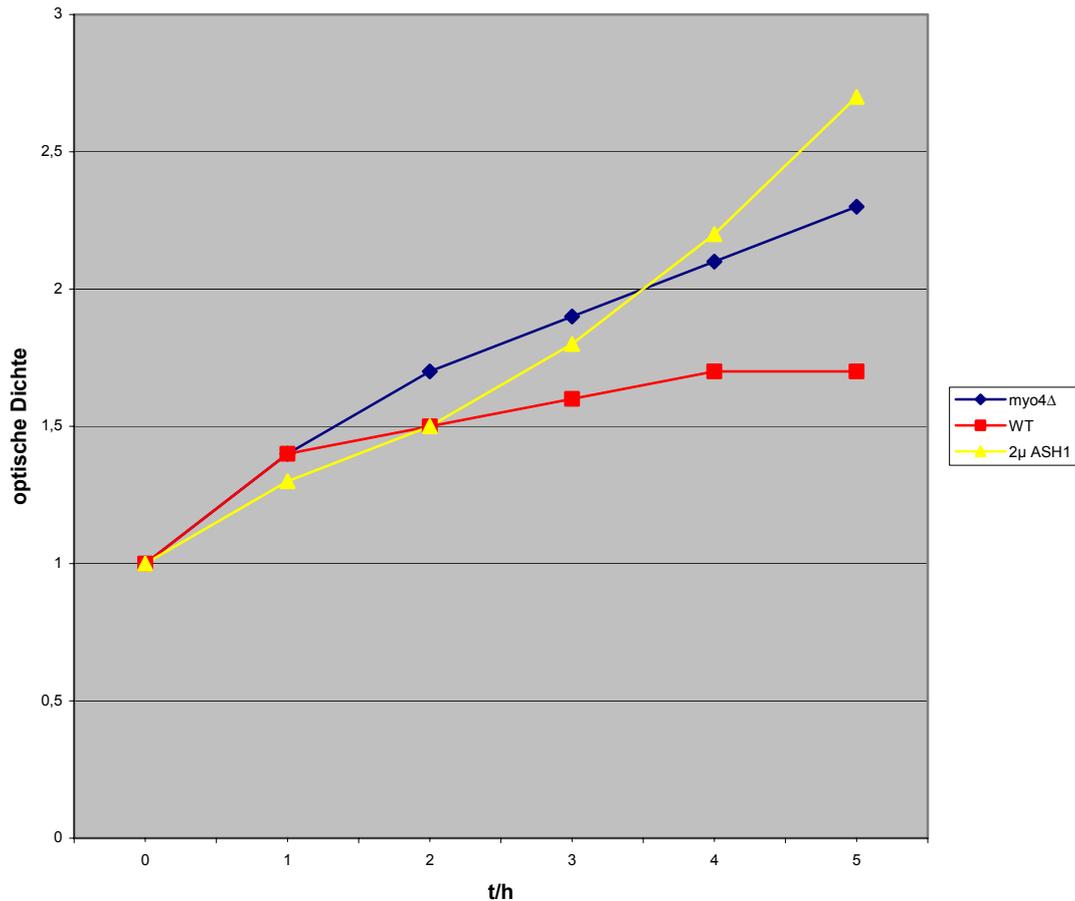


Abb. 2-21 Die Teilungsrate eines *ASH1* überexprimierenden Wildtypstammes (2 μ ASH1) im Vergleich zu einem WT und *myo4 Δ Stamm. Nachdem die Zellen in Minimalmedium überführt wurden, wurde die Wachstumskurve durch stündliches Messen der OD₆₀₀ erstellt.*

Die Wachstumskurven in Abbildung 2.21 zeigen, daß sich die Teilungsrate eines hungernden Wildtyp Stammes durch die Überexpression von *ASH1* erhöht, ähnlich einem *myo4* Deletionsstamm. Die Erhöhung der Teilungsrate ist *MYO4* und *ASH1* abhängig.

2.15 Das Expressionslevel von *PCL5* korreliert mit den Überlebenschancen der Hefe unter Nährstoffmangel

Die Ursache für eine erhöhte Teilungsrate unter Nährstoffmangel kann möglicherweise auch ein bestimmter Schwellenwert von *PCL5* sein. Neben der symmetrischen Verteilung von Ash1p in *myo4* Δ Zellen und in Zellen die *ASH1* überexprimieren, ist eine weitere Gemeinsamkeit, die geringere *PCL5* Transkriptionsrate. Die *PCL5* mRNA Expressionsstärke

gleicht sich der des Wildtyps jedoch wieder an, wenn die *myo4Δ* Zellen *ASH1* nicht exprimieren. Die Wachstumsrate dieser *myo4Δ/ash1Δ* Doppelmutante ist nicht von der Wachstumsrate eines Wildtyps zu unterscheiden. Ein *myo4Δ* Stamm, der zusätzlich in der codierenden *PCL5* Region mutiert ist, nimmt ebenfalls wieder das Wachstumsverhalten des Wildtyps an. Eine bloße Zerstörung der Asymmetrie von Ash1p kann als Ursache ausgeschlossen werden, da sich *she2Δ* Zellen unauffällig vermehren.

Um einen möglichen Zusammenhang zu finden, haben wir die Überlebenschancen der verschiedenen Stämme auf Minimalplatten mit Hilfe des Tröpfchentests analysiert (Abb.2.22). Zunächst wurde das Wachstum abnehmender Konzentrationen eines Wildtypstammes mit einem *myo4Δ* Stamm auf YEPD und Minimalplatten verglichen. Die Überlebenschancen des Wildtyps sind auf Minimalplatten geringer als auf Vollmedium. Besitzt die Hefe jedoch eine Mutation im *MYO4* Gen, verringert sich die Überlebenschance unter Nahrungsmangel nicht. Hefezellen, die *ASH1* überexprimieren zeigen ebenfalls sowohl auf YEPD als auch auf Minimalplatten gleiches Wachstumverhalten. Eine Überexpression des *PCL5* Gens wirkt sich unter Nährstoffmangel toxisch auf Wildtypzellen aus. Ein *myo4Δ* Stamm, der mit einem 2μ *PCL5* Plasmid transformiert wurde, wächst unter Nährstoffmangel ungehemmt weiter, möglicherweise, weil in einem *myo4* Deletionsstamm die *PCL5* Transkription herabgesetzt ist (siehe 2.6). Eine Deletion im *MYO4* Gen oder eine Überexpression von *ASH1* resultiert in einer verbesserten Adaption der Hefezellen an limitierende Nährstoffe. Es scheint, als würde das Expressionslevel des Cyclins *PCL5* auf die Überlebenschancen der Hefe unter Nährstoffmangel einwirken.

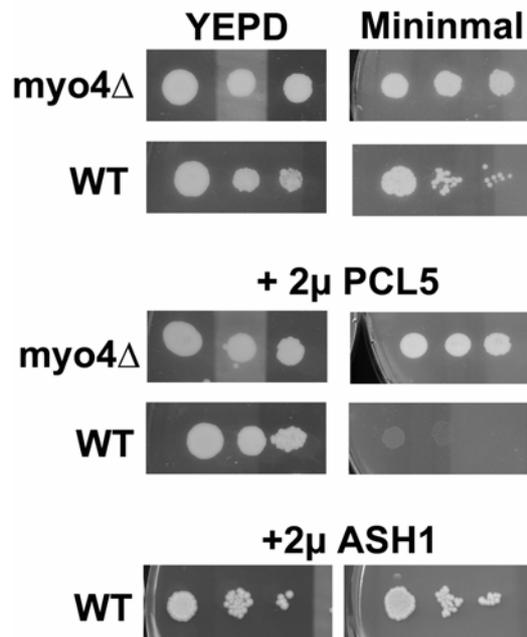


Abb. 2-22 Das Expressionslevel von *PCL5* korreliert mit den Überlebenschancen bei Nährstoffmangel. Abnehmende Konzentrationen von Wildtyp (WT), WT + 2μ*ASH1*, WT + 2μ*PCL5*, *myo4Δ* und *myo4Δ* + 2μ*PCL5* Hefezellen wurden jeweils auf YEPD- und Minimalplatten pipettiert. Die Platten wurden drei Tage bei 30°C inkubiert, anschließend wurde das Wachstum der verschiedenen Stämme analysiert.

2.16 Die erhöhte Teilungsrate eines *myo4Δ* Stammes ist spezifisch für Aminosäuremangel

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* weist die Fähigkeit auf, sich an die gegebenen Nahrungsvorräte in ihrer Umgebung anpassen zu können. Für eine Vielzahl an Veränderungen in der Umgebung sind Regulationswege vorhanden, die ein Überleben ermöglichen. Zu nennen wären neben Sporulation und Stickstoffmangel mit seinen Folgen, die Gcn4p-abhängige Aminosäuren Biosynthese, die Glucose-Aktivierung und der „diauxic shift“, der den Gebrauch der vorhandenen Kohlenstoffquelle reguliert und in Glykolyse und Zitronensäurezyklus resultiert.

Wie schon in der Einleitung (1.6) erwähnt, ist die CDK Pho85p in die Gcn4p-abhängige Aminosäuren-Biosynthese involviert. Das Pho85-Cyclin Pcl5p ist an der negativen „feedback“ Regulation des Transkriptionsfaktors *GCN4* beteiligt.

Da die erhöhte Teilungsrate des *myo4Δ* Stammes möglicherweise im Zusammenhang mit der Gcn4p-abhängigen Aminosäure Biosynthese steht, war es offensichtlich zu testen, ob die verbesserte Adaption an Nährstoffmangel spezifisch für Aminosäuremangel ist.

Die aerobe Energiegewinnung der Hefe unterteilt sich in drei Abschnitte, beginnend mit dem Abbau großer Moleküle. Polysaccharide werden in einfache Zucker zerlegt, Proteine werden zu einzelnen Aminosäuren hydrolisiert und Fette in Glycerin und Fettsäuren abgebaut. Der zweite Abschnitt dient der Gewinnung des Acetyl-CoAs, welches im dritten Abschnitt in den Zitratzyklus und die oxidative Phosphorylierung eingeht.

Wird einer Hefekultur anstelle der üblichen Glucose, Glycerin zugegeben, verwerten die Hefezellen Glycerin zur Energiegewinnung. Da sie Glycerin aber weniger gut verwerten können, befinden sie sich in einem Hungerzustand. Glycerin muß in Glyceraldehyd-3-P umgewandelt werden, bevor es in die Glykolyse eingehen kann.

Ist also die erhöhte Teilungsrate eines *myo4Δ* Stammes spezifisch für Aminosäuremangel, so sollten *myo4Δ* Zellen sich nicht von Wildtypzellen unterscheiden, wenn sie eine schlechter verwertbare Kohlenstoffquelle zur Energieerzeugung erhalten. Wildtyp und *myo4Δ* Zellen wurden in Vollmedium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1 herangezogen und dann in YEP Medium mit Glycerin überführt. Aus den stündlich gemessenen OD₆₀₀ Werten wurde eine Wachstumskurve erstellt (Abb.2.23).

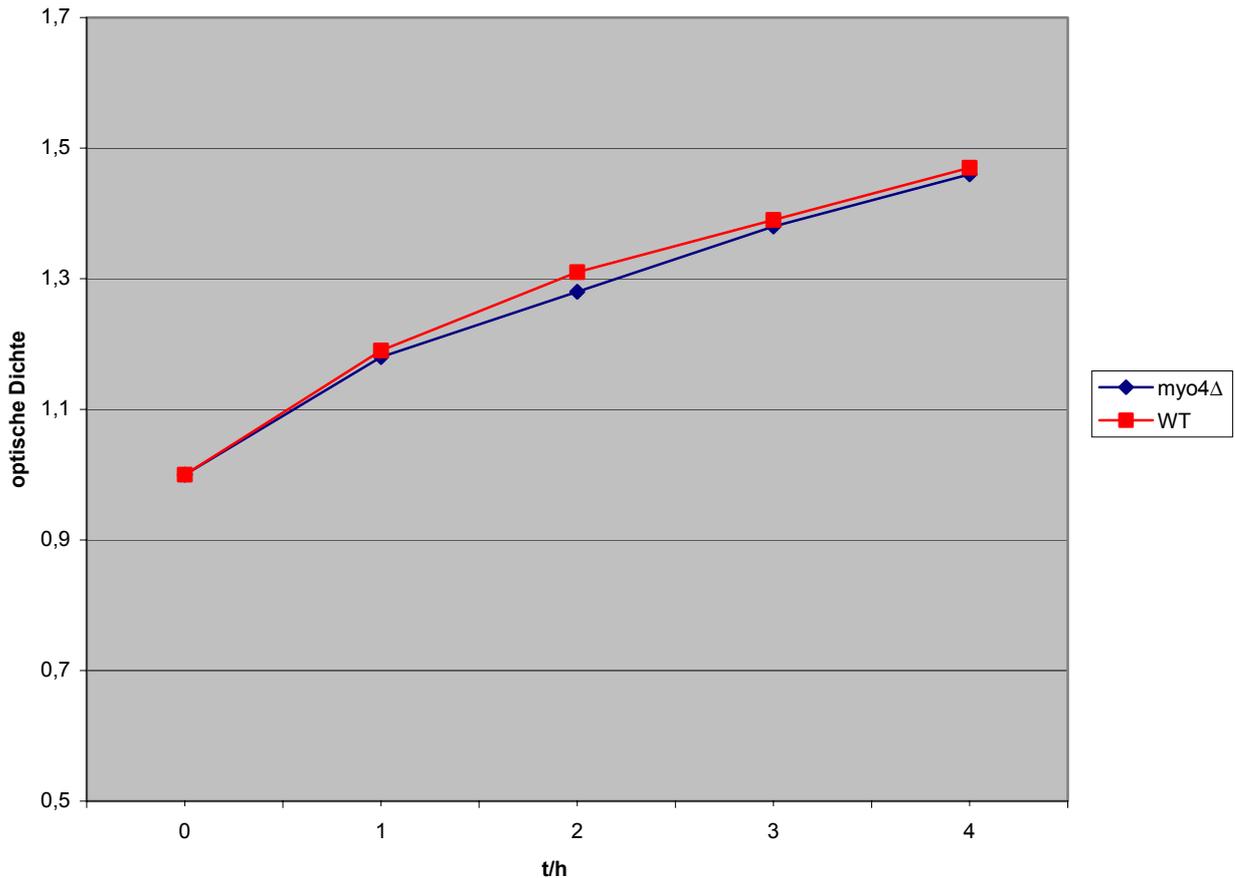


Abb. 2-23 Wachstumskurven der *myo4Δ* und Wildtyp (WT) Zellen in YEP-Glycerin. Wildtyp und *myo4Δ* Zellen wurden in YEP-Glucose bis zu einer OD_{600} von ca. 1 herangezogen und anschließend in frisches YEP-Glycerin Medium überführt. Die optische Dichte wurde stündlich gemessen.

Wird den *myo4Δ* und Wildtypzellen Glucose als Energiegewinnung entzogen und stattdessen Glycerin zur Verfügung gestellt, ist kein Unterschied in ihrer Teilungsrate zu erkennen. Die erhöhte Teilungsrate eines *myo4* Deletionsstammes ist spezifisch für eine Unterversorgung an Aminosäuren.

2.17 Pcl5p ist *MYO4*- und *ASH1*-abhängig asymmetrisch lokalisiert

Die intrazelluläre Lokalisation eines Cyclins oder eines CDK-Cyclin Komplexes ist oftmals gekoppelt mit seiner temporalen Aktivitätsregulation. Über die Lokalisation des Cyclins Pcl5p ist bislang nichts bekannt. Da die CDK Pho85p im Zellkern lokalisiert ist (Pries, Bomeke et

al. 2002), kann davon ausgegangen werden, daß ihr Cyclin Pcl5 zumindest zu dem Zeitpunkt wenn Pho85 und Pcl5 einen Komplex bilden, sich ebenfalls im Zellkern befindet.

Zunächst wurde genomisches *PCL5* C-terminal mit 3x HA markiert. Eine positive Markierung wurde über PCR geprüft. Die Primer wurden so gewählt, daß eine positive Markierung durch einen Größenunterschied leicht erkennbar ist.

PCL5-3xHA ist unter seinem endogenen Promotor jedoch weder durch Westernblot-Analyse, noch in der Immunfluoreszenz detektierbar. Aus diesem Grund wurde das *PCL5-3xHA*-Fragment aus dem Genom der Hefe mittels PCR amplifiziert, in einen induzierbaren GAL-Vektor kloniert und in haploide und diploide *myo4Δ*, *ash1Δ* und Wildtypstämme transformiert. Nach einer Induktionsdauer von 2,5 Stunden wurde eine Westernblot-Analyse und Immunfluoreszenz durchgeführt.

Auf dem Westernblot ist die Induktion des ca. 26 kDa Pcl5-3xHA zu erkennen (Abb.2.24). Trotz gleicher aufgetragener Gesamtproteinmenge ist in diploiden *myo4Δ* Zellen die Pcl5-3xHA Proteinmenge geringer als in haploiden *myo4Δ* Zellen und Wildtypzellen.

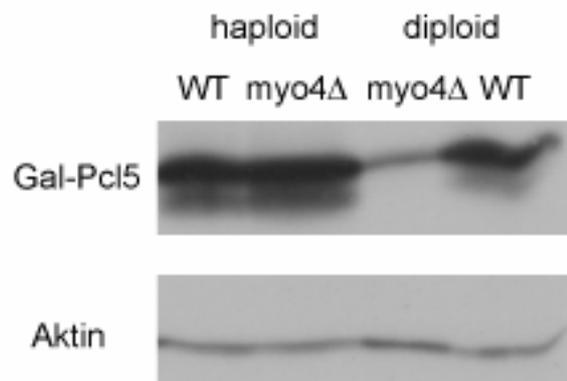


Abb. 2-24 Westernblotanalyse des Galaktose-induzierten Pcl5p in haploiden und diploiden Wildtyp- bzw. *myo4Δ* Zellen. Nach einer Induktionsdauer von 2,5h wurden Proteinextrakte hergestellt und gleiche Gesamtproteinmenge aufgetragen. 3xHA markiertes Pcl5p wurde mittels eines anti-HA Antikörpers detektiert. Als Ladekontrolle dienendes Aktin wurde mittels eines anti-Aktin Antikörpers detektiert.

In der Immunfluoreszenz zeigt Pcl5-3xHA eine spezifische Lokalisation im Mutterzellkern der haploiden und diploiden Wildtypzellen (Abb2.25). In diploiden *ash1Δ* Zellen befindet sich Pcl5-3xHA symmetrisch auf Mutter- und Tochterzellkern verteilt. Diese Aufhebung der Asymmetrie erwartet man im Falle der *HO*-Endonuclease in haploiden Zellen. Bislang konnte dies jedoch noch nicht gezeigt werden. Sobald *ASH1* nicht mehr funktionell ist, kann Ash1p

die Transkription von *HO* nicht mehr inhibieren und *HO* wird auch in der Tochter exprimiert. In diploiden *myo4Δ* Zellen ist das Pcl5-3xHA Protein nicht detektierbar. Dies könnte eine Folge der symmetrischen Verteilung des Transkriptionsfaktors Ash1p sein. In einem *myo4* Deletionsstamm wird die *ASH1* mRNA nicht mehr an die Spitze der Knospe transportiert und folglich ist Ash1p symmetrisch auf die Zellkerne der Tochter und Mutter verteilt. Wenn Ash1p ein Transkriptionsrepressor von *PCL5* ist, dann unterdrückt es die Transkription nicht nur in der Tochter, wie in Wildtypzellen, sondern auch in der Mutter. Anders als im Falle der *HO*-Endonuclease, die für den Paarungstypwechsel haploider Hefezellen verantwortlich ist, wird die Lokalisation des Cyclins Pcl5 diploidspezifisch reguliert. In haploiden *myo4Δ* und *ash1Δ* Zellen wird Pcl5-3xHA genauso wie im Wildtyp nur im Zellkern der Mutter detektiert (Immunfluoreszenz nicht gezeigt).

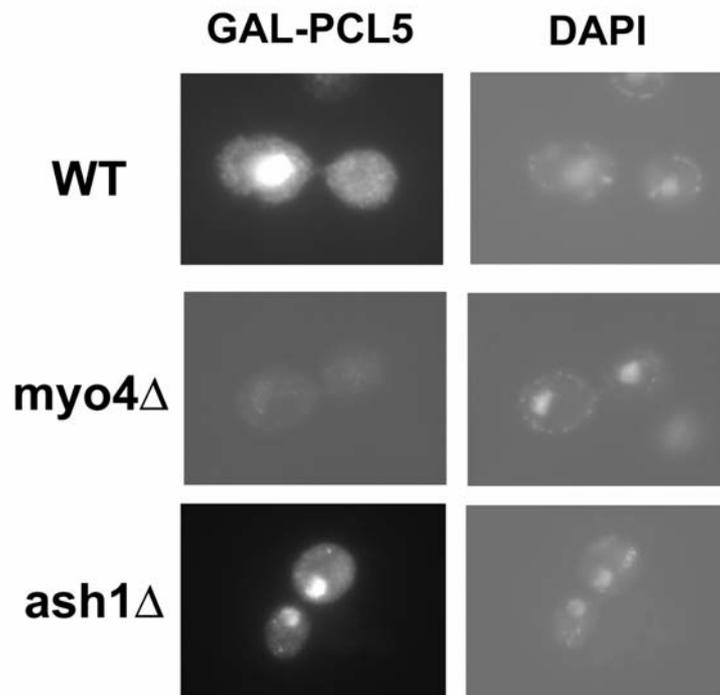


Abb. 2-25 Die Lokalisation des Cyclins Pcl5p. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von Pcl5-3xHA detektiert. Nach Induktion von Pcl5-3xHA wurde dessen Lokalisation in *myo4Δ*, *ash1Δ* und Wildtyp (WT) Zellen verglichen. Im Wildtyp (WT) lokalisiert Pcl5-3xHA asymmetrisch im Zellkern der Mutter. Diese asymmetrische Verteilung des Pcl5 Proteins wird sowohl in *ash1* Mutanten, als auch in *myo4* Mutanten aufgehoben. In *myo4Δ* Zellen ist Pcl5-3xHA nicht detektierbar. In *ash1Δ* Zellen ist Pcl5-3xHA gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzellkern verteilt.

2.18 Die asymmetrische Verteilung von Ash1p ist *PCL5*-abhängig

Die CDK Pho85 ist notwendig für die asymmetrische Akkumulation des Ash1 Proteins (McBride, Sil et al. 2001). In einem haploiden *pho85Δ* Stamm wird Ash1p im Mutterzellkern mislokalisiert. Der Grund dieser symmetrischen Verteilung des Ash1p ist eine Stabilisierung des Proteins. Pho85p benötigt für seine Kinase-Aktivität und Substratspezifität wie jede CDK eine Cyclin Untereinheit. Welches der 10 Pho85-Cycline für die Stabilisierung des Ash1 Proteins verantwortlich ist, ist bislang nicht ersichtlich. Zwar konnte McBride in vitro zeigen, daß ein Pho80-Pho85 Komplex in der Lage ist Ash1p zu phosphorylieren, ob jedoch in vivo diese Spezifität erhalten bleibt ist nicht bewiesen. Möglicherweise spielt das Pho85-Cyclin Pcl5 in vivo eine Rolle. Wie sieht die Verteilung des Ash1 Proteins in einer *pcl5* Mutante aus? Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde die 9myc-tag markierte Version von Ash1p detektiert (Abb.2.26). Im Wildtypstamm zeigen 66% der Postanaphase-Zellen ein Signal ausschließlich im Tochterzellkern, in 24% der Zellen wird Ash1 verstärkt im Zellkern der Tochter detektiert, jedoch sind auch Signale im Mutterzellkern vorhanden und nur 11% haben eine symmetrische Verteilung des Ash1 Proteins. Die *pcl5* Mutante zeigt im Kontrast nur in 39% der Postanaphase-Zellen eine asymmetrische Verteilung des Proteins, 36% zeigen ein stärkeres Signal im Zellkern der Tochter und in 26% wird eine symmetrische Verteilung des Ash1p detektiert.

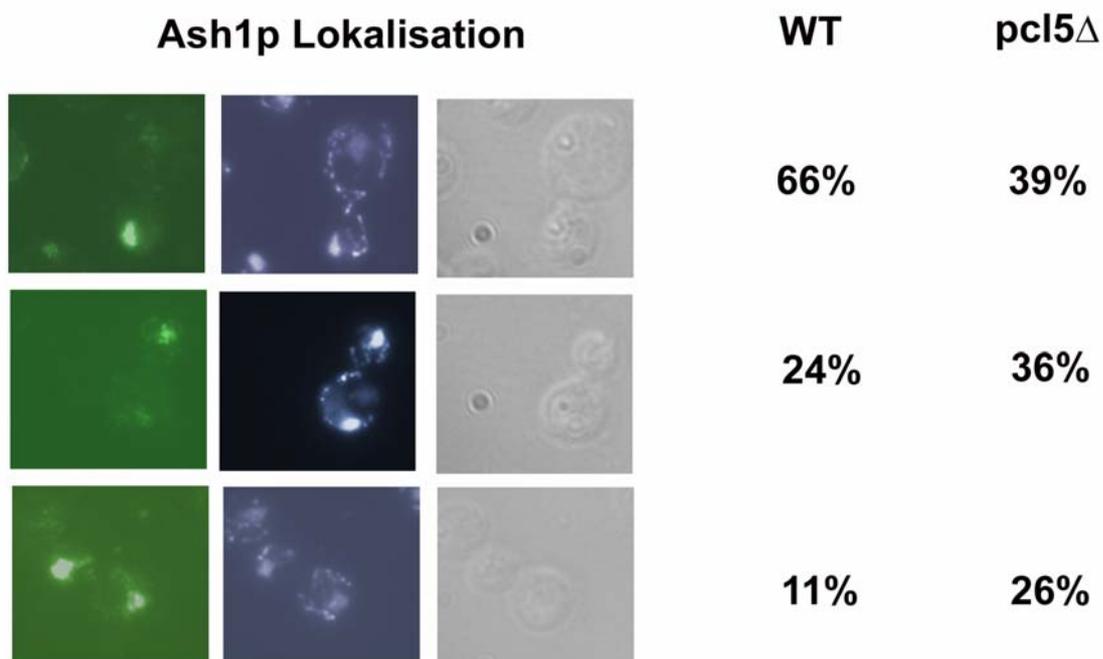


Abb. 2-26 Veränderte Ash1 Protein Lokalisation in einer *pcl5* Mutante. Eine indirekte Immunfluoreszenz wurde mit einem haploiden Wildtyp (WT) und einem haploiden *pcl5Δ* Stamm

durchgeführt. Jede Reihe zeigt jeweils eine Postanaphase-Zelle, rechts die DIC-Aufnahme, in der Mitte die DAPI-Färbung (blau) und linke das 9myc-Ash1p Signal (grün). Die obere Reihe ist ein Beispiel für eine asymmetrische Verteilung des Ash1 Proteins, die mittlere Reihe zeigt eine Zelle, die ein stärkeres Signal im Tochterzellkern und ein schwaches Signal im Zellkern der Mutter vorweist, die untere Reihe ist ein Beispiel für die symmetrische Verteilung des Ash1 Proteins. Die Anzahl der Zellen, die das jeweilige Signal zeigen ist rechts in Prozent angegeben (Die Anzahl der gezählten Zellen pro Stamm betrug 130).

In einer *pho85* Mutante ist das Ash1 Protein nur noch in 30% der Postanaphase Zellen asymmetrisch im Tochterzellkern lokalisiert (McBride, Sil et al. 2001). In einer *pcl5* Mutante verhält es sich ähnlich, was ein Hinweis darauf sein könnte, daß es sich bei *PCL5* um das Cyclin handelt, welches zusammen mit *PHO85* für die Lokalisation bzw. die Stabilität des Ash1 Proteins in vivo verantwortlich ist.

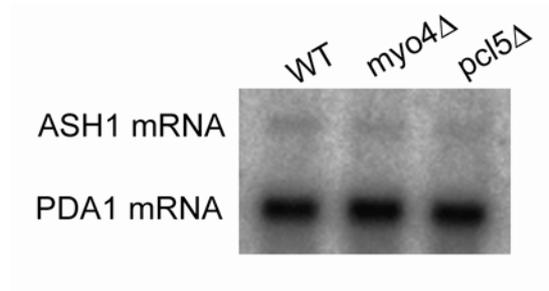
2.19 *ASH1* mRNA mislokalisiert in einem haploiden *pcl5*Δ Stamm

Eine Mutation in einem der *SHE* Gene führt zu einer Mislokalisierung von Ash1p als Folge der delokalisierten *ASH1* mRNA. Die Mislokalisierung des Ash1 Proteins in einem *pho85*Δ Stamm wird jedoch nicht durch die Delokalisation der *ASH1* mRNA verursacht. Der Transport oder die Verankerung der *ASH1* mRNA ist in einer *pho85* Mutante nur minimal gestört. In 60% der Zellen wird ein Signal an der Spitze der Knospe detektiert, in Wildtypzellen ist dies in 78% der Zellen der Fall. Nur 2% der Wildtypzellen zeigen keine Lokalisation der *ASH1* mRNA, die Anzahl erhöht sich auf 22% in einer *pho85* Mutante und auf bis zu 100% in einer *she* Mutante (McBride, Sil et al. 2001).

Die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz lassen darauf schließen, daß ein Pho85-Pcl5 Komplex für die Lokalisierung des Ash1 Proteins verantwortlich ist. Es läßt sich nicht ausschließen, daß eine Mislokalisierung von Ash1p in einer *pcl5* Mutante auf eine Mislokalisierung der *ASH1* mRNA zurückzuführen ist.

Die Lokalisation der *ASH1* mRNA wurde in Wildtyp und *pcl5*Δ Zellen, die *ASH1* überexprimieren durch in-situ-Hybridisierung mit DIG-markierten *ASH1*-Gegenstrang-Transkripten analysiert (Abb.2.28). In 66% der Wildtyp-Zellen wird die *ASH1* mRNA mondsichelartig in der Knospe der späten Anaphase-Zellen detektiert. Diese distinkte Lokalisation ist in einer *pcl5* Mutante nahezu aufgehoben. Nur 24% der *pcl5*Δ Zellen zeigen eine Lokalisation der *ASH1* mRNA. Die relative Menge der *ASH1* mRNA ist in beiden Stämmen identisch (Northernblot-Analyse, Abb.2.27).

Im Gegensatz zur CDK Pho85 hat Pcl5 nicht nur einen Effekt auf die Lokalisation des Ash1 Proteins, sondern auch auf die Lokalisation der korrespondierenden mRNA, wie die statistische Auswertung der in-situ-Hybridisierung ergab.



	WT	myo4Δ	pcl5Δ
relative Expressionsstärke	0,077	0,065	0,075

Abb. 2-27 Die relative *ASH1* mRNA ist identisch in Wildtyp und *pcl5Δ* Zellen. Als Kontrolle diente ein *myo4Δ* Stamm, der *ASH1* mRNA nicht lokalisiert. Auf dem Northernblot wurde die 2,3 Kb *ASH1* und die 1,3 Kb *PDA1* mRNA mit Hilfe von ³²P-markierten Sonden detektiert. Die relative Expressionsstärke wurde über das Verhältnis *ASH1/PCL5* ermittelt.

ASH1 mRNA Lokalisation

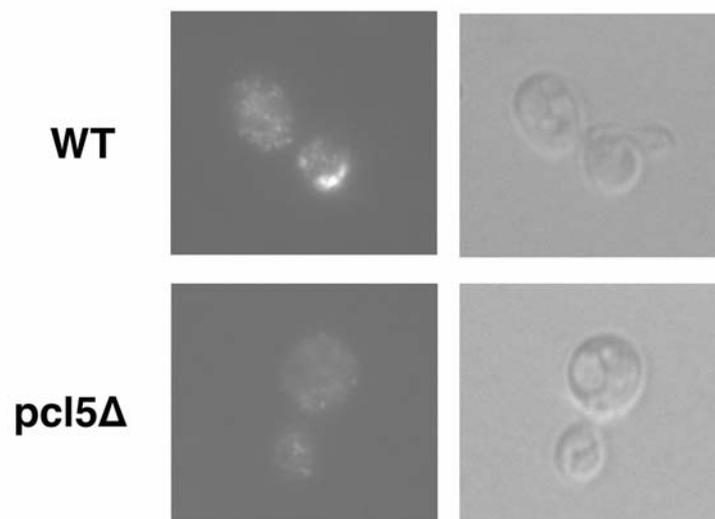


Abb. 2-28 *ASH1* mRNA mislokalisiert in einem *pcl5Δ* Stamm. In einer in-situ-Hybridisierung wurde der Einfluß einer *pcl5* Mutation auf die *ASH1* mRNA Lokalisation analysiert. Die *ASH1* mRNA wurde mit DIG-gekoppelten *ASH1*-Gegenstrang-Transkripten, einem Anti-DIG Antikörper und einem sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörper detektiert (links). Rechts sind DIC-Aufnahmen der jeweiligen Zellen zu sehen.

2.20 Myo4p lokalisiert an die Knospenspitze in *pcl5Δ*

Das Myosin Myo4p lokalisiert in 90% der Zellen an die Knospenspitze der Tochterzelle. Für die Lokalisation der *ASH1* mRNA ist ein funktionelles Myo4p absolut notwendig. Die Lokalisation des Myo4 Proteins ist abhängig von den *SHE*-Genen, *SHE2* und *SHE3*. Eine mögliche Ursache für die Mislokalisierung der *ASH1* mRNA in *pcl5* Mutanten könnte mislokalisiertes Myo4p sein.

Um die Lokalisation in *pcl5Δ* Zellen zu überprüfen wurde genomisches *MYO4* C-terminal mit einer 3x HA Kasette markiert. Als Kontrolle wurde *MYO4* in Wildtypzellen mit 3x HA C-terminal markiert. Die Markierung wurde mittels Westernblot verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die indirekte Immunfluoreszenz zeigt deutlich die Lokalisation des Myo4p an die Knospenspitze in Wildtypzellen (WT, Abb.2.29). *PCL5* hat keinen Einfluß auf die Lokalisation von Myo4. In einem *pcl5* Deletionsstamm ist Myo4p genauso wie im Wildtyp an der Spitze der Knospe lokalisiert (*pcl5Δ*, Abb.2.29). Eine Mislokalisierung des Motorproteins Myo4 in einem *pcl5Δ* Stamm ist nicht die Ursache für die symmetrische Verteilung von Ash1p bzw. die Mislokalisierung der *ASH1* mRNA.

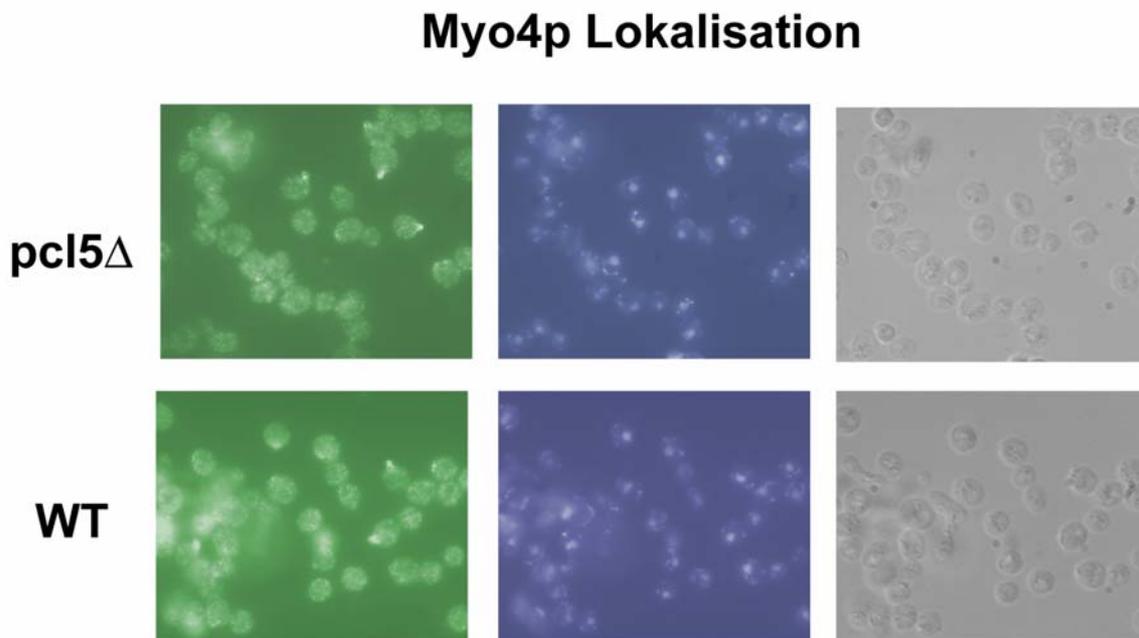


Abb. 2-29 Lokalisation des Myo4p-3xHA Fusionsproteins in *pcl5Δ* und Wildtypzellen (WT). *MYO4* wurde genomisch mit 3x HA markiert. Das Fusionsprotein wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert (grün). In der Mitte die DAPI-Färbung (blau) und rechts die DIC-Aufnahme des jeweiligen Ausschnitts. Myo4p lokalisiert in WT und *pcl5Δ* Zellen an die Knospenspitze.

2.21 Ist2p ist delokalisiert in *pcl5*Δ

Durch einen Genom-übergreifenden Screen nach weiteren lokalisierten mRNAs identifizierten Takizawa et al. 11 weitere mRNAs die mit der Transportmaschinerie der bis dato einzigen lokalisierten mRNA in *S.cerevisiae*, der *ASH1* mRNA interagieren. Von diesen 11 lokalisiert nur eine spezifisch in Tochterzellen (Takizawa, DeRisi et al. 2000). Bei dieser mRNA handelt es sich um das Transkript des putativen Ionenkanals Ist2. Die asymmetrische Verteilung des Ist2 Proteins zur Plasmamembran der Tochterzelle wird durch die Lokalisation der *IST2* mRNA an die Knospenspitze vermittelt (Takizawa, DeRisi et al. 2000). Für die asymmetrische Verteilung des Ist2 Proteins werden die She Proteine benötigt.

Ich konnte zeigen, daß für die Asymmetrie des Ash1 Proteins das Cyclin *PCL5* notwendig ist (siehe 2.18). Die Frage war jetzt, wird in einer *pcl5* Mutante die Asymmetrie nur im speziellen Fall von Ash1p zerstört oder auch die eines weiteren Proteins, dem Ist2p? Die mRNA beider Proteine wird mit der gleichen Acto-Myosin-Maschinerie an die Knospenspitze transportiert und folglich sind die Proteine asymmetrisch verteilt.

Mit Hilfe eines integrativen Plasmids von Christoph Jüschke (ZMBH, Universität Heidelberg) konnte diese Frage beantwortet werden. Durch homologe Rekombination wurde ein GAL induzierbares YFP-*IST2* Konstrukt in das Genom einer *pcl5* Deletionsmutante, in einen *she2*Δ und in einen Wildtypstamm integriert. Die Integration wurde mittels PCR-Southern und Westernblot verifiziert. Für die Westernblot-Analyse wurden die Zellen nach einem modifizierten Zellaufbruch-Protokoll aufgebrochen (C.Jüschke). Dieses Protokoll ermöglicht Plasmamembranproteine quantitativ zu analysieren. Anschließend wurde YFP-Ist2p mit einem monoklonalen GFP-Antikörper detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Verifizierung durch PCR-Southern war notwendig, da sowohl in *she2*Δ als auch in *pcl5*Δ Zellen selbst nach einer Galaktose-Induktion von drei Stunden, in der Westernblot-Analyse nur ein schwaches YFP-Ist2p Signal zu sehen ist.

Das Ergebnis der Westernblot-Analyse korrespondiert mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz. Nach einer Stunde Induktion sieht man in Wildtypzellen Ist2p an die Membran der Tochterzelle lokalisiert und ein schwächeres Signal am Zellkortex der Mutter (Abb.2.30). In *she2* Mutanten geht diese Asymmetrie verloren. Die Deletion des Cyclins *PCL5* zeigt ebenfalls eine Delokalisation des Ist2 Proteins. Ist die Ist2 Proteindelokalisation in *pcl5*Δ Zellen eine Folge der Mislokalisierung der *IST2* mRNA?

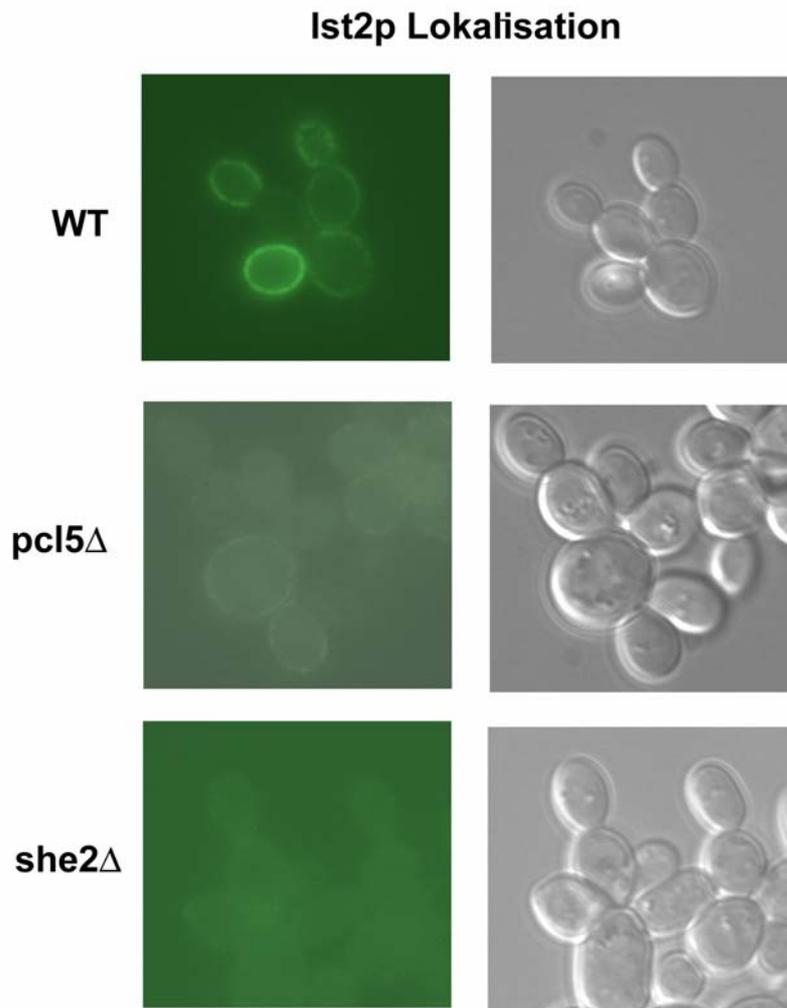


Abb. 2-30 In vivo Lokalisation von YFP-Ist2p. Die Verteilung von YFP-Ist2p wurde nach einer Stunde Galaktose-Induktion unter dem Mikroskop beobachtet (grün). Rechts davon sind die DIC-Aufnahmen der beobachteten Zellen. YFP-Ist2p lokalisiert in Wildtypzellen (WT) verstärkt an die Plasmamembran der Tochterzelle. Diese asymmetrische Verteilung von YFP-Ist2p ist in *she2* und *pcl5* Deletionsmutanten nicht mehr vorhanden.

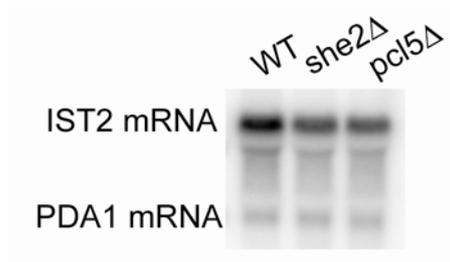
2.22 In einem *pcl5*Δ Stamm ist *IST2* mRNA nicht mehr spezifisch an der Knospenspitze lokalisiert

Das Cyclin *PCL5* ist in die asymmetrische Verteilung zweier Proteine involviert, deren mRNA mit der gleichen Transportmaschinerie an die Knospenspitze transportiert wird (siehe 2.18 und 2.22). Ich konnte zeigen, daß die symmetrische Verteilung von Ash1p in *pcl5*Δ Zellen möglicherweise eine Folge der Mislokalisierung der *ASH1* mRNA ist. Es ist anzunehmen, daß die Delokalisierung des Ist2 Proteins ebenso eine Folge der Mislokalisierung der korrespondierenden mRNA ist.

Eine Northernblot-Analyse nach drei Stunden Galaktose-Induktion eines Wildtyp und *pcl5*Δ Stammes, die jeweils das GAL-YFP-*IST2* Konstrukt in ihr Genom integriert haben ergab, daß

sich die relative Menge der *IST2* mRNA in beiden Stämmen nicht signifikant unterscheidet (Abb.2.31).

Die Lokalisation der *IST2* mRNA wurde durch in-situ-Hybridisierung mit DIG-markierten *IST2*-Gegensinn-Transkripten analysiert (Abb.2.32). In Wildtypzellen lokalisiert die *IST2* mRNA an der Knospenspitze. In der *pcl5* Deletionsmutante wurde kein lokalisiertes Signal der *IST2* mRNA detektiert. Zellen die eine Mutation im *PCL5* Gen besitzen sind nicht mehr in der Lage, die *IST2* mRNA an ihren Bestimmungsort zu transportieren und folglich ist Ist2p delokalisiert. In welchen Schritt des Transports der mRNA *PCL5* involviert ist, kann mit diesem Experiment nicht bestimmt werden. Auszuschließen ist anhand der Northernblot-Daten, daß *PCL5* einen Einfluß auf die Stabilität der mRNA hat.



	WT	she2Δ	pcl5Δ
relative Expressionsstärke	10,7	7,3	7,2

Abb. 2-31 Die relative *IST2* mRNA ist identisch in Wildtyp, *she2Δ* und *pcl5Δ* Zellen. Auf dem Northernblot wurde die 3,8 Kb *IST2* und die 1,3 Kb *PDA1* mRNA mit Hilfe von ³²P-markierten Sonden detektiert. Die relative Expressionsstärke wurde über das Verhältnis *IST2/PCL5* ermittelt.

IST2 mRNA Lokalisation

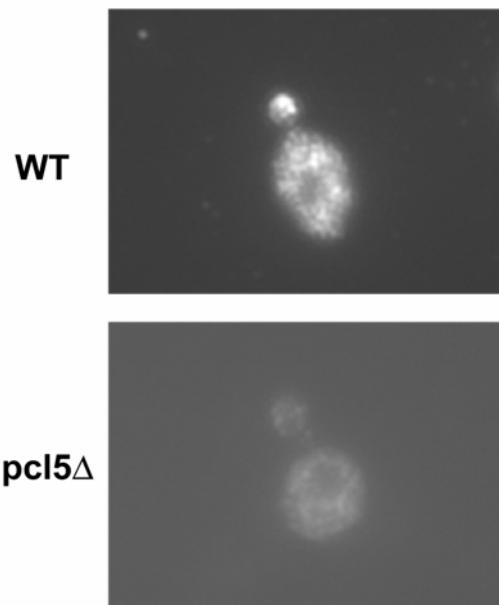


Abb. 2-32 Für die Lokalisation der *IST2* mRNA zur Knospenspitze wird das Cyclin *PCL5* benötigt. In einer in-situ-Hybridisierung wurde der Einfluß einer *pcl5* Mutation auf die *IST2* mRNA Lokalisation analysiert. Die *IST2* mRNA wurde mit DIG-markierten *IST2*-Gegensinn-Transkripten, einem anti-DIG Antikörper und einem sekundären Fluorochrom gekoppelten Antikörper detektiert.

3 Diskussion

Der GATA-ähnliche Transkriptionsfaktor *ASH1* übernimmt in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine wichtige Funktion, die Kontrolle des Vorgangs des Paarungstypswechsels. Hierbei handelt es sich um einen einfachen Differenzierungsprozess, der das Überleben einer Spezies gewährleistet. Durch die Möglichkeit der sexuellen Fortpflanzung, auch wenn es sich um eine elementare geschlechtliche Vermehrung wie im Hefepilz handelt, wird eine ausreichende Rekombinationshäufigkeit garantiert. Genetische Umstrukturierungen sind notwendig, um auf Umweltveränderungen zu reagieren und so die Nachfahren zu sichern.

ASH1 ist kein essentielles Gen. Die Evolution zeigt, daß sich Organismen nur langsam einer veränderten Umgebung anpassen. Für ein kurzfristiges Überleben der Hefezelle und ihrer Nachkommen wirkt es sich keinesfalls letal aus, wenn ihnen die Fähigkeit genommen wird, die *HO*-Endonuclease zu reprimieren. Ash1p akkumuliert im Zellkern der Tochter am Ende der Anaphase. Hier bindet es direkt an eine Konsensussequenz in der URS1 des *HO*-Promotors und reprimiert die *HO*-Endonuclease. Folglich kann die sich abschnürende Tochterzelle in der nächsten Zellzyklusrunde ihren Paarungstyp nicht wechseln.

Ein Hungern diploider Hefezellen löst die Sporulation aus, sie durchlaufen eine Meiose und bilden Sporen. Sobald die Wachstumsbedingungen optimal sind, keimen die Sporen aus. Die haploiden Zellen können sich dann entweder vegetativ vermehren oder sie kehren durch Konjugation zweier Zellen unterschiedlichen Paarungstyps zur diploiden Vegetationsphase zurück. Die Grundvoraussetzung der sexuellen Konjugation haploider Hefezellen ist ihr gegensätzlicher Paarungstyp. Diesen erhalten die haploiden Hefezellen durch die asymmetrische Aktivierung der *HO*-Endonuclease. Die asymmetrische Expression der *HO*-Endonuclease wiederum wird durch eine asymmetrische Verteilung des Transkriptionsfaktors Ash1p gesteuert. Die spezifische Akkumulation von Ash1p im Tochterzellkern ist abhängig von den 5 *SHE*-Genen, die für eine polarisierte Lokalisation der *ASH1* mRNA sorgen.

Die Transportmaschinerie, die für die asymmetrische Lokalisation der *ASH1* mRNA verantwortlich ist, transportiert noch eine weitere mRNA an die Knospenspitze der Tochterzelle. Hierbei handelt es sich um die mRNA des asymmetrisch verteilten möglichen Ionenkanals Ist2. Ist2 Protein lokalisiert an die Plasmamembran der Tochterzelle.

Im Gegensatz zur nicht geklärten Funktion der asymmetrischen Verteilung des möglichen Ionenkanals Ist2p ist die asymmetrische Akkumulation des Transkriptionsrepressors Ash1p alleine durch seine Funktion im Paarungstypwechsel sehr sinnvoll. Hierdurch wird in einer Kultur ein 1:1 Verhältnis der paarungsfähigen Zellen gewährleistet. Statistisch gesehen sollten

somit immer gleich viele a- wie α -Zellen vorhanden sein. Um dieses Verhältnis beizubehalten ist es notwendig, daß eine Tochterzelle im folgenden Zellzyklus die Fähigkeit besitzt, den Paarungstyp zu wechseln. Ash1p muß also nach der G1 Phase zerstört werden. Erste Erkenntnisse zur Degradation des Ash1 Proteins konnten von McBride und Kollegen erbracht werden (McBride, Sil et al. 2001). Eine Deletion der Cyclin-abhängigen Kinase Pho85 führt zu einer Mislokalisierung von Ash1p im Mutterzellkern und zu einer Stabilisierung des Ash1 Proteins. Pho85 ist eine nicht essentielle Cyclin-abhängige Kinase und assoziiert mit zehn verschiedenen Cyclinen, die nach Sequenzhomologien in zwei Unterfamilien geordnet sind. Der Pho80 Unterfamilie gehören Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8 und Pcl10 an, zur Pcl1,2 Unterfamilie werden Pcl1, Pcl2, Clg1, Pcl5 und Pcl9 zugeordnet. Die meisten Transduktionswege, an denen Pho85 beteiligt ist, werden durch Veränderungen in der Umgebung der Zelle aktiviert. Es scheint, als würde die Kinase-Aktivität des jeweiligen Pho85-Komplexes der Zelle signalisieren, ob die augenblickliche Umgebungssituation hinreichend ist (Carroll and O'Shea 2002).

3.1 Konservierte Funktionen des Transkriptionsfaktors *ASH1* in *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*

Dimorphismus ist ein charakteristisches Merkmal vieler Pilze. Hierzu gehört nicht nur der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae*, sondern auch der humanpathogene Pilz *Candida albicans*. Die Möglichkeit zwischen knospenden und hyphalen bzw. pseudohyphalen Wachstum zu wechseln, wird als Antwort auf Veränderungen in der Umwelt angewandt. Im Falle des pathogenen Pilzes *C.albicans* gilt der Polymorphismus als Virulenz-Determinante.

ASH1 besitzt neben der Funktion, die *HO*-Endonuclease zu reprimieren, eine wichtige Funktion in der pseudohyphalen Differenzierung der Hefe *S.cerevisiae*. Eine Deletion des *ASH1* Gens führt zum Verlust der Fähigkeit Pseudohyphen auszubilden, während eine Überexpression von *ASH1* zu einem verstärkten pseudohyphalen Wachstum führt.

Wir konnten zeigen, daß das von K. Kahlina (Diplomarbeit 2002, Universität Heidelberg) isolierte *C.albicans* *ASH1*-Homolog in *S.cerevisiae* asymmetrisch im Zellkern der Tochterzelle lokalisiert und in der Lage ist die Defekte einer *ash1* Mutante teilweise zu komplementieren.

Die einzige bekannte Funktion des GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktors *ASH1* in haploiden *S.cerevisiae* Zellen ist die Reprimierung der *HO*-Endonuclease. Ash1p bindet direkt an die

Konsensussequenz YTGAT innerhalb der URS1 des *HO*-Promotors (Maxon and Herskowitz 2001). Folglich wird die Expression von *HO* reprimiert und die Tochterzelle kann ihren Paarungstyp nicht wechseln. Ash1p aus *Saccharomyces cerevisiae* kann die Expression des Reporter-Gens *HO-ADE2* reprimieren. Das *ASH1* Homolog aus *Candida albicans* (*CaASH1*) ist hierzu nicht in der Lage. Dieses Misslingen könnte mit dem außergewöhnlichen Gebrauch des CUG-Kodons zusammenhängen. Die codierende Sequenz des *CaASH1* Gens besitzt zwei CUG-Kodons (an der Nukleotid-Position 1102 und 1270). In *C.albicans* werden diese Stellen in Serin translatiert, in *S.cerevisiae* zu Leucin. Durch diesen Unterschied in der Translation könnte die spezifische Funktion, die für die erfolgreiche Reprimierung von *HO* benötigt wird, gestört sein. Ein kompletter Funktionsverlust durch die Missinterpretation des CUG-Kodons ist jedoch auszuschließen, da *CaASH1* den Verlust der Pseudohyphen-Ausbildung in einem *ash1Δ* Stamm mit der gleichen Effizienz wie *S.cerevisiae* *ASH1* (*ScASH1*) komplementieren kann.

Der dimorphe Wechsel beschränkt sich nicht nur auf diploide Hefezellen, obgleich die sichtbaren morphologischen Veränderungen in diploiden Zellen ausgeprägter sind. Die Expression der *HO*-Endonuclease ist jedoch eine Eigenschaft ausschließlich haploider Hefezellen. Bislang konnte noch keine haploide Form eines *Candida albicans* Stammes identifiziert werden. Auch wurde im Rahmen des *C.albicans* Sequenzierungsprojektes kein mögliches *HO*-Homolog gefunden. Es ist also nicht verwunderlich, daß CaAsh1p nicht in der Lage ist, *HO* zu reprimieren. *Candida albicans* besitzt zwar einen MAT-ähnlichen Locus (MTL, mating-type-like), der sich aber vom MAT-Locus der Bäckerhefe in seiner genetischen Struktur unterscheidet. Im MTL-Locus befindet sich keine Palindrom-Sequenz, wie sie im *S.cerevisiae* MAT-Locus zu finden ist und von der *HO*-Endonuclease erkannt wird. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß ein diploider *Candida albicans* *MTLa/mtlaΔ* Stamm sich mit einem *mtlaΔ/MTLa* Stamm paaren kann (Hull, Raisner et al. 2000; Tzung, Williams et al. 2001). Ob die tetraploiden Nachkommen in der Lage sind, durch Meiose wieder diploide Nachfahren zu erzeugen ist bislang nicht erwiesen. Aber die Möglichkeit, daß *C.albicans* einen kompletten sexuellen Lebenszyklus besitzt, ist gegeben.

Wir konnten eindeutig zeigen, daß ein Fragment bestehend aus der 1359 bp codierenden *CaASH1* Sequenz plus 501 bp der 5'Region und 452 bp der 3'Region nicht in der Lage ist, das Reporter-gen *HO-ADE2* zu reprimieren. Zur gleichen Zeit konnten Inglis und Johnson zeigen, daß ein Fragment bestehend aus der codierenden *CaASH1* Sequenz plus 1kbp der 5'Region und 185 bp der 3'Region die Expression eines *HO* Reporter-gens regulieren kann (Inglis and Johnson 2002). Dieses gegensätzliche Ergebnis könnte möglicherweise ihre

Ursache in einer unterschiedlichen Interpretation haben. Inglis und Johnson zeigten, daß *CaASH1* das Reporter-gen *HO-CAN1* reprimiert. Ist Canavanin im Medium vorhanden, ist die Expression von *CAN1* letal. Zellen, die neben dem Reportersystem auch *CaASH1* exprimieren können auf Canavinin-haltigem Medium überleben. Es scheint also, daß *CaASH1* in der Lage ist, *HO-CAN1* zu reprimieren. Jedoch wurde nicht getestet, ob die Anzahl der überlebenden Zellen die gleiche ist, wenn *CaASH1* oder *ScASH1* exprimiert wird. Wir sehen, daß Zellen die neben dem Reportersystem *HO-ADE2* auch *CaASH1* exprimieren in der Lage sind auf Adenin-freiem Medium zu überleben. *HO-ADE2* wird also nicht reprimiert. Allerdings ist die Anzahl, der Kolonien geringer im Vergleich zu Kontroll-Zellen, die *HO-ADE2* exprimieren. Das heißt möglicherweise ist *CaASH1* in gewissem Maße fähig, ein *HO*-Reportersystem zu regulieren, jedoch bei weitem nicht so effektiv wie *ScASH1*.

Eine besondere Eigenschaft des ScAsh1 Proteins ist seine asymmetrische Verteilung. Ash1p akkumuliert im Zellkern der Tochterzelle. Wir konnten zeigen, daß sowohl das yEGFP-markierte *Saccharomyces cerevisiae* Ash1p als auch das yEGFP-markierte *Candida albicans* Ash1p im Zellkern der Tochter von sich teilenden *S.cerevisiae* Zellen angereichert ist. Beide yEGFP-markierten Proteine konnten jedoch nicht unter ihrem endogenen Promotor detektiert werden. Aus diesem Grund exprimierten wir die Fusionsproteine von einem induzierbaren *MET25* Promotor. Da die Expression von CaAsh1p durch einen heterologen Promotor gesteuert wurde, können wir sicher sagen, daß die asymmetrische Verteilung von CaAsh1p nicht von einer Tochterzell-spezifischen Genaktivierung herrührt.

Die Zell-spezifische Akkumulation des ScAsh1 Proteins in *Saccharomyces cerevisiae* ist abhängig von der Lokalisation der korrespondierenden mRNA an die Spitze der Tochterzelle. *Candida albicans* *ASH1* mRNA akkumuliert in der Tochterzelle von sich teilenden *S.cerevisiae* Zellen. Interessanterweise wird auch *CaASH1*, ebenso wie *ScASH1*, nur in spät-mitotischen Zellen (wenn beide Zellkerne schon vorhanden sind) exprimiert. Die asymmetrische Verteilung der mRNA der beiden *ASH1* Homologe unterscheidet sich jedoch. Während *ScASH1* mRNA mondsichelartig an die Spitze der Tochterzelle lokalisiert, ist *CaASH1* mRNA im gesamten Cytoplasma der Tochterzelle detektierbar. In beiden Fällen beobachtet man dennoch keine gleichmäßige Färbung, sondern einzelne Partikel. Die lässt darauf schließen, daß die mRNA in großen Komplexen vorliegt. Für *ScASH1* mRNA wurde die Existenz von Ribonukleoprotein Komplexen bewiesen, die aus *ScASH1* mRNA und den Proteinen Myo4, She2 und She3 bestehen (Bertrand, Chartrand et al. 1998; Bohl, Kruse et al. 2000; Takizawa and Vale 2000). *ScASH1* mRNA wird in Ribonukleoprotein Partikel (RNP) verpackt und abhängig vom Motorprotein Myo4 und dem Aktinzytoskelett an die Spitze der

Tochterzelle transportiert und dort verankert. Für die Ortsbestimmung der *ScASH1* mRNA sind 4 Lokalisationselemente verantwortlich. E1, E2A und E2B, die innerhalb des Ash1p codierenden Bereichs liegen und E3, welches kurz vor dem Stopcodon beginnt und sich bis in die 3'UTR zieht. Jedes dieser Elemente ist alleine ausreichend, um eine Reporter RNA mit Hilfe der Transportmaschinerie in die Tochterzelle zu lokalisieren

Nun stellt sich die Frage, wenn *CaASH1* mRNA von der Transportmaschinerie in *S.cerevisiae* erkannt wird und in die Tochterzelle transportiert wird, warum ist *CaASH1* mRNA nie als cortical-begrenztes Signal erkennbar, wie dies der Fall für *ScASH1* mRNA ist?

Eine mögliche Antwort hierauf ist, daß *CaASH1* mRNA zwar Signale besitzt, die von der Transportmaschinerie erkannt werden und so zum Transport in die Tochterzelle führen, aber diese nicht ausreichend sind, um eine cortikale Verankerung zu veranlassen. Für die Lokalisation der *ScASH1* mRNA wird angenommen, das ein Zusammenwirken der 4 Lokalisationselemente die Voraussetzung für eine feste cortikale Verankerung der mRNA ist (Bertrand, Chartrand et al. 1998; Chartrand, Meng et al. 1999). Die Identifikation und Analyse von Lokalisationselementen innerhalb der *Candida albicans* *ASH1* mRNA sind unerlässlich, um diese Frage zu beantworten.

3.2 PCL5, Zielgen des Transkriptionsfaktors Ash1p

Ash1p besitzt eine Zinkfinger-ähnliche Domäne, ähnlich der Zinkfinger Domäne der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren. Es kann also angenommen werden, daß Ash1p wie viele andere Mitglieder der GATA- und GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, sowohl als Repressor als auch als Aktivator verschiedener Gene fungieren kann.

Die bislang einzige genau beschriebene Funktion als Transkriptionsrepressor beschränkt sich auf die negative Regulation der haploid-spezifischen *HO*-Endonuklease. Die Transkriptionsregulation des *HO*-Locus ermöglicht eine für die Differenzierung der haploiden Hefezelle nötige Asymmetrie des Paarungstyps. Ash1p, welches asymmetrisch im Tochterzellkern spät-mitotischer Zellen zu finden ist, bindet dort direkt an die Konsensussequenz YTGAT innerhalb der URS1 des *HO*-Promotors (Maxon and Herskowitz 2001). Folglich wird *HO* reprimiert und die Hefezelle kann ihren Paarungstyp nicht wechseln. Die Funktion des Paarungstypwechsels ist auf haploide Zellen begrenzt, jedoch exprimieren auch diploide Hefezellen *ASH1*. Welche Rolle spielt der asymmetrisch verteilte Transkriptionsfaktor *ASH1* in diploiden *Saccharomyces cerevisiae* Zellen?

Chandarlapaty und Errede konnten Ash1p eine essentielle Funktion in einem Differenzierungsprozess diploider *S.cerevisiae* Zellen zuordnen (Chandarlapaty and Errede 1998). Ash1p spielt eine bislang nicht exakt erforschte Rolle im pseudohyphalen Wachstum von Hefezellen. Eine *ash1* Deletion führt zu einer drastischen Reduktion der Pseudohyphen-Formation, die durch Stickstoffmangel ausgelöst wird. Eine *ASH1* Überexperimierung wiederum verstärkt das pseudohyphale Wachstum der Hefezellen. Pan und Heitman konnten zeigen, daß Ash1p die Expression des Gens *FLO11* positiv reguliert und somit die für die Ausbildung der Pseudohyphen notwendige Zell-Zell-Adhesion gewährleistet (Pan and Heitman 2000). Eine Differenz der *FLO11* Transkriptionsstärke konnten wir auf den DNA-Arrays nicht bestätigen, da die Transkriptionstärke zu gering war, um eine klare Aussage machen zu können.

Um mögliche Zielgene des GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktors *ASH1* zu identifizieren wurde eine Microarray-Analyse (GeneFilters[®]) durchgeführt. In einer heterogenen Kultur werden statistisch jedoch nur 50% der spät-mitotischen Zellen *ASH1* exprimieren, nämlich nur die Tochterzellen. Um die Anzahl der *ASH1* exprimierenden Zellen zu erhöhen, wurde ein *myo4Δ* Stamm gewählt. Ist *MYO4* deletiert, wird die *ASH1* mRNA nicht mehr an die Spitze der Tochterzelle transportiert und folglich wird Ash1p symmetrisch lokalisiert, d.h. Ash1p befindet sich nicht nur im Zellkern der Töchter spät-mitotischer Zellen sondern auch im Zellkern der spät-mitotischen Mütter (Bobola, Jansen et al. 1996; Sil and Herskowitz 1996). Vergleicht man das Gen-Expressionsmuster eines *myo4Δ* Stammes mit dem Expressionsmuster einer *myo4Δ/ash1Δ* Doppelmutante, so wirkt sich eine durch die Deletion von *ASH1* herbeigeführte Differenz im Expressionsmuster stärker aus, als sie das tun würde, wenn ein WT-Stamm mit einem *ash1Δ* Stamm verglichen würde.

Nach viermaligem Wiederholen des Experiments betrug die Anzahl der differentiell regulierten Gene im Durchschnitt 319, wobei etwa eine gleiche Anzahl Gene auf- und abreguliert wurden. Nachteile der Microarray-Analyse sind die hohe Varianz und die Tatsache, daß nicht nur direkt regulierte Gene identifiziert werden, sondern möglicherweise indirekt abhängige Signaltransduktionswege.

Die wohl häufigste angewandte mathematische Methode des „Clusterings“ zur Analyse der großen Datenmenge einer Microarray-Analyse ist in meinem Fall wenig aussagekräftig. Die Fragestellung nach einzelnen Zielgenen eines Transkriptionsfaktors benötigt nicht das Auflisten der Gene, die ein ähnliches Transkriptionsmuster zeigen. Wir stellten vielmehr die Frage, welche differentiell regulierten Gene können tatsächlich Zielgene des GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktors *ASH1* sein. Aus diesem Grund interessierte ich mich zunächst

nicht für solche Gene, deren Funktion völlig unbekannt ist. Unter den Genen, die gleichbleibend zuverlässig differentiell exprimiert wurden, suchte ich nach Genen, die im Zusammenhang mit pseudohyphalem Wachstum bereits identifiziert wurden. Zum Zeitpunkt meiner Analyse war kein Gen darunter, welches in pseudohyphalen Differenzierungsprozessen involviert ist. Also stellte ich mir die Frage, welche der differentiell regulierten Gene könnten möglicherweise in Differenzierungsprozesse der Hefe verwickelt sein?

Ein guter Kandidat war das Cyclin *PCL5*. Nach Verifizierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse durch Northernblot-Analyse konnten wir sicher sagen, daß das Gen *PCL5* in einem *myo4Δ* Stamm herunterreguliert ist. Durch wiederholte Northernblot-Analyse, die zuverlässige Resultate lieferte, konnte ausgeschlossen werden, daß es sich bei der differentiell regulierten Expression von *PCL5* um einen Varianz-Fehler handelt. Warum ist aber das Cyclin *PCL5* ein guter Kandidat?

PCL5 gehört zur Familie der Pcl's (Pho85 Cyclin's), die durch Sequenzhomologien in zwei Unterfamilien unterteilt sind. Sie interagieren mit der Cyclin-abhängigen Kinase Pho85. Die Antworten, die die Pho85-Komplexe vermitteln, beziehen sich auf den Metabolismus verschiedener Nährstoffe und das Fortschreiten des Zellzyklus. Es sind zum größten Teil Antworten auf Veränderungen in der extrazellulären Umgebung der Zelle. Für Pcl5p-Pho85p konnte eine Rolle in der Degradation des Transkriptionsfaktor Gcn4p nachgewiesen werden. Gcn4p ist verantwortlich für das Überleben der Hefezellen, wenn nicht ausreichend Aminosäuren und Purine zur Verfügung stehen. Takaku et al. und Tripathi et al. konnten zeigen, daß das *GCN4* Homolog in *Candida maltosa* und in *Candida albicans* eine Rolle in der pseudohyphalen Differenzierung spielt (Takaku, Horiuchi et al. 2002; Tripathi, Wiltshire et al. 2002). Eine *pcl5* Deletion hat allerdings im Gegensatz zu einer *ash1* Deletion keinen Effekt auf die Formation von Pseudohyphen in *S.cerevisiae* (Daten nicht gezeigt). Daß die Pcl-Familie dessen ungeachtet an Regulationswegen, die die Morphogenese der Hefezelle betreffen, beteiligt ist, zeigt der Phänotyp einer „quintuplen“ Mutante. Wenn die komplette Pcl1,2 Unterfamilie deletiert wird, zeigen die Hefezellen Charakteristiken diploider pseudohyphaler Zellen oder Zellen, die Defekte in der Zytokinese oder Zellseparation besitzen. Diese morphologischen Abnormalitäten konnten wir ebenfalls in haploiden und diploiden *ash1Δ/pcl5Δ* Zellen sehen. Im Gegensatz hierzu besitzt eine *ash1Δ/pcl1Δ* Doppelmutante keine morphologischen Abnormalitäten. Eine zusätzliche Deletion im *MYO4* Gen wiederum revertiert den Phänotyp der *ash1Δ/pcl5Δ* Doppelmutation. Eine *MYO4*-Überexprimierung auf der anderen Seite führt zu ähnlichen morphologischen Abnormalitäten,

wie eine *ash1Δ/pcl5Δ* Doppelmutation (Haarer, Petzold et al. 1994). Möglicherweise konkurriert das Myosin Myo4p ohne Fracht mit anderen Myosinen. Schon Haarer et al. schlug 1994 vor, daß die Ursache der morphologischen Abnormalitäten, die durch die Überexprimierung von *MYO4* hervorgerufen werden, eine Blockade der Funktion des Myosin Myo1p und einem möglichen weiteren Myosin ist. Wahrscheinlich wird die leichte Kette *CMD1* durch einen Überfluss des Myosins Myo4p austitriert.

Kürzlich wurden neben *ASH1* und *IST2* mRNA als Fracht von Myo4p mit Hilfe einer Kombination aus Immunpräzipitation, DNA-Microarray-Analyse und GFP-RNA Visualisierung 22 weitere Fracht-mRNAs der She-Maschinerie identifiziert (Shepard, Gerber et al. 2003). Es scheint als wäre *PCL5* für ein Beladen des Transportmoleküls Myo4p verantwortlich. Übt Myo4p nicht seine vorgesehene Funktion aus, nämlich mRNAs in die Tochterzelle zu transportieren, hat dies den gleichen Effekt wie eine Überexpression von *MYO4*.

Eine einwandfreie Zell-Morphogenese benötigt eine Polarisierung von Wachstum und Sekretion, welche wiederum abhängig ist von der dynamischen Funktion des Aktin-Zytoskeletts. *RVS167* (*reduced viability on starvation*) spielt nicht nur eine Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts, sondern interagiert auch mit Pho85-Komplexen (Lee, Colwill et al. 1998). In einem Two-Hybrid-Assay konnte gezeigt werden, daß Rvs167p mit Aktin interagiert, möglicherweise indirekt über das Aktin-bindende Protein Abp1p. Eine Mutation im *RVS167*-Gen führt zu Abnormalitäten der Zell-Morphologie von hungernden Zellen und zu Defekten des Aktin-Zytoskeletts. Mikroskopie-Aufnahmen zeigen eine Delokalisation der Aktin-„patches“ in *rvs167Δ* und *pho85Δ* Mutanten. Eine ähnliche Delokalisation der Aktin-„patches“ konnte ich in *ash1Δ/pcl5Δ* Zellen zeigen.

Erwähnenswert ist, daß sowohl *RVS167* als auch *ABP1* in der Microarray-Analyse in einem *myo4Δ* Stamm im Vergleich zu einem *myo4Δ/ash1Δ* Stamm zu den hochregulierten Genen zählen. Ob und inwiefern eine Differenz in der Genexpression von *RVS167* und *PCL5* in einem *myo4Δ* Stamm mit einer in vitro Interaktion von GST-Rvs167p und Pcl5p in Verbindung steht ist, noch völlig unbeantwortet.

Da es sich hier um nicht essentielle Gene handelt, könnte wie von Lee et al. postuliert die Funktion von Pcl-Pho85 und Rvs167 in Protein-Komplexen dazu dienen, das Aktin-Zytosklett als Antwort auf Stressfaktoren wie Nahrungsmangel zu regulieren (Lee, Colwill et al. 1998).

3.3 Transkriptionsregulation und Funktion des Cyclins *PCL5*

Das Überleben einer Hefezelle in ihrer natürlichen Umgebung ist abhängig von ihrer Fähigkeit, sich an die schnellen Veränderungen anzupassen. Als Antwort auf eine Veränderung ihrer Umgebung findet eine schnelle transkriptionelle Umprogrammierung statt, die sowohl auf Aktivierung als auch Reprimierung der Expression verschiedener Gene basiert.

PCL5 ist Partner der Cyclin-abhängigen Kinase Pho85. Die Vermutung, daß eine der zellulären Funktionen von *PCL5* die Koordination von Veränderungen in metabolischen Prozessen als Antwort auf Nahrungsmangel bzw. Stress ist, konnte von Jia et al. durch eine globale Microarray-Analyse bestätigt werden (Jia, Larossa et al. 2000). Hefezellen wurden dem Herbizid Sulfometuron Methyl (SM), einem Inhibitor der Aminosäure-Biosynthese ausgesetzt. Diese Stress-Induktion bewirkte eine 15-fache Erhöhung der *PCL5* Gen-Expression. Eine Überexprimierung von *PCL5* wiederum führt dazu, daß die Hefezellen dem Herbizid SM gegenüber hypersensitiv sind.

Ich konnte mit Hilfe der Northernblot-Analyse zeigen, daß in Wildtyp-Zellen, die dem Stressfaktor Nahrungsmangel (Stickstoff- oder Aminosäurenmangel) exponiert waren, zu einer Erhöhung der *PCL5* Genexpression kam. Diese erhöhte *PCL5*-Transkriptionsrate unter Stressbedingungen ist in Zellen, die eine Mutation im *MYO4* Gen besitzen, nicht vorhanden. Der Effekt, daß eine *myo4* Deletion zu einem niedrigeren *PCL5*-Expressionslevel führt, ist unter Aminosäuremangel jedoch signifikanter als unter Stickstoffmangel. Ob die Ursache hierfür eine Aminosäuremangel-Spezifität ist können wir bislang nicht beantworten.

Wird in *myo4Δ* Zellen noch zusätzlich *ASH1* deletiert, sind diese Zellen wieder in der Lage, die *PCL5* Transkriptionsrate unter Stressbedingungen zu erhöhen. Im Gegensatz hierzu zeigen Zellen, die *ASH1* überexprimieren keine erhöhte *PCL5* Transkriptionsrate unter Nahrungsmangel. Hieraus schließe ich, daß es sich bei *ASH1* möglicherweise um einen Repressor der *PCL5* Transkription handelt. Wenn die Transkription von *PCL5* nicht direkt von Ash1p reprimiert wird, dann aktiviert Ash1p entweder einen Repressor oder reprimiert einen Aktivator.

Eine Limitierung der Nährstoffe wirkt sich auf den Zellzyklus von *Saccharomyces cerevisiae* aus. Hungernde Hefezellen erfahren unter Nahrungsmangel eine Verzögerung der G1-Phase. In einer gemischten Kultur erhöht sich die Anzahl der Zellen, die sich in G1 befinden, wenn Zellen aus Vollmedium in Minimalmedium überführt werden und so dem Stressfaktor „Hunger“ ausgesetzt werden. Das Cyclin *PCL5* wird Zellzyklus-spezifisch reguliert mit einem

Transkriptionsmaximum in der G1-Phase. Interessanterweise steigt in einem *myo4Δ* Stamm die Zahl der G1-Zellen nicht. In *myo4Δ* Zellen erhöht sich zudem die Transkriptionsrate des Cyclins *PCL5* unter Nahrungsstress nicht. Wenn *PCL5* den Metabolismus der Hefezellen einem limitierten Vorrat an Nährstoffen anpasst, aber in *myo4Δ*-Zellen die *PCL5* Gen-Expression den Verhältnissen nicht angeglichen wird, dann fehlt diesen Zellen das Signal „Hunger“ und ihr Zellzyklus bzw. Metabolismus wird nicht umgestellt. Eine Verzögerung der G1-Phase findet nicht statt. Dies konnte ich nicht nur morphologisch zeigen, sondern auch auf der Basis der Genexpression von *CLN2* und *PCL1*. Der in G1 gebildete Cdc28/Cln3 Komplex stimuliert die Transkription der Cycline *CLN1* und *CLN2*. Nach einem Anstieg der Konzentration von Cln1p und Cln2p bilden diese Proteine mit Cdc28 Komplexe, die das Überschreiten des START-Punktes und das Einsetzen der S-Phase fördern. Der Cdc28/Cln2 Komplex erreicht sein Aktivitätsmaximum kurz nach Überschreiten des START-Punktes. Cln2 aktiviert seine eigene Expression. Die *CLN2* Transkriptionsrate in hungernden *myo4Δ* Zellen bleibt konstant hoch, was beweist, daß sich vermehrt Zellen ansammeln, die sich unmittelbar am Einsetzen der S-Phase befinden. Das Cyclin *PCL1* besitzt ein dem *CLN2* ähnliches Transkriptionsprofil. In Abwesenheit des Cln1,2-Cdc28 Komplexes ist ein Pcl1,2-Pho85 Komplex essentiell für das Passieren des START-Punktes. In Wildtypzellen wird die Transkription von *PCL1* um den Faktor 10 herabgesenkt, nachdem diese Zellen von Vollmedium in Minimalmedium transferiert werden. In *myo4Δ* Zellen ist dies nicht zu beobachten. Warum wirkt sich ein Fehlen der G1-Phase-Verzögerung unter Nahrungsmangel jedoch nicht negativ auf die Zellen aus?

Ich konnte beobachten, daß Hefezellen, die eine Mutation im *MYO4* Gen besitzen, eine höhere Teilungsrate unter Nahrungsmangel haben als Wildtypzellen. Auch eine Überexprimierung von *ASH1* spiegelt sich in einer erhöhten Teilungsrate der hungernden Zellen wider. Wird zusätzlich *ASH1* in einem *myo4Δ* Stamm deletiert, steigt das Expressionslevel von *PCL5* unter Nährstoffmangel und die Zellen zeigen keine erhöhte Wachstumsrate. Eine *PCL5* Deletion wirkt sich jedoch nicht auf den Zellzyklus aus, möglicherweise weil ein weiteres Mitglied der Pcl-Familie seine Funktion übernimmt.

Wie schon erwähnt führt eine Überexprimierung von *PCL5* dazu, daß die Hefezellen dem Herbizid SM gegenüber hypersensitiv sind (Jia, Larossa et al. 2000). Übereinstimmend hierzu konnte ich sehen, daß wenn Wildtypzellen, die *PCL5* überexprimieren einem weiteren Stressfaktor, nämlich Nährstoffmangel ausgesetzt sind, sich dies letal auf die Zellen auswirkt. Eine eingeschränkte Transkription von *PCL5* bewirkt eine bessere Adaption der Hefezellen an eine limitierende Nährstoffzufuhr aus dem Medium. Verursacht wird die Einschränkung der

PCL5 Transkription höchstwahrscheinlich durch eine symmetrische Verteilung von Ash1p, wie dies der Fall in *myo4Δ* Zellen oder in Zellen, die *ASH1* überexprimieren ist. Dagegen spricht allerdings, daß eine Mutation in *SHE2*, welche ebenfalls eine symmetrische Verteilung des Ash1 Proteins veranlasst, keinen Effekt auf die Transkription von *PCL5* hat. Eine symmetrische Verteilung des Ash1 Proteins kann also nicht die alleinige Ursache für eine erniedrigte Transkriptionsrate sein. Möglicherweise spielt die Lokalisation des Myosins Myo4 ebenfalls eine Rolle. In Hefezellen, die *ASH1* überexprimieren ist Myo4p an die Spitze der Tochterzelle lokalisiert. Claudia Kruse konnte zeigen, daß die Myo4p Lokalisation *SHE2* und *SHE3* abhängig ist. In einem *she2* Deletions-Stamm ist die Myo4p Lokalisation an die Knospenspitze um mehr als 60% reduziert (Dissertation Claudia Kruse, 2002).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, daß Myo4p eine Rolle in der Vererbung des kortikalen ERs spielt. Myo4p ist verantwortlich für den Transport des kortikalen ERs von der Mutter- zur Tochterzelle. Dieser Transport ist She2p-unabhängig (Estrada, Kim et al. 2003). Möglicherweise wird ein zusätzlicher Faktor, der in die Regulation der Genexpression von *PCL5* involviert ist, von Myo4p She2p-unabhängig in die Tochterzelle transportiert. Obwohl die Lokalisation des Myosin Myo4p zumindest zu einem Teil abhängig vom RNA-bindenden Protein She2 ist, ist Myo4p noch an mindestens einem weiteren She2p-unabhängigen Transport beteiligt. Zu diesem Zeitpunkt können wir über die Regulation der Genexpression des Cyclins *PCL5* nur sagen, daß die *PCL5*-Transkription *MYO4* und *ASH1* abhängig, aber *SHE2* unabhängig reguliert wird. Desweiteren können wir sagen, daß eine fehlende Hochregulierung der *PCL5*-Transkriptionsrate in hungernden *myo4Δ* und *ASH1* überexprimierenden Zellen eine bessere Adaption an den Stressfaktor „Hunger“ ermöglicht. Die erhöhte Teilungsrate dieser Zellen ist spezifisch für Aminosäuremangel. Wird den Hefezellen Glucose als Energiegewinnung entzogen und stattdessen Glycerin zur Verfügung gestellt, ist im Vergleich zu Wildtyp-Hefezellen kein Unterschied in ihrer Teilungsrate zu erkennen.

Ein wichtiger Aspekt war die Frage, ob die Ursache bei der durch Northernblot-Analyse gezeigten Differenz der Genexpression von *PCL5* eine Veränderung der mRNA Stabilität oder eine Veränderung der Transkriptionsaktivierung ist. Mit Hilfe des *PCL5*-Promotor-Luziferase Reportersystems konnte ich eindeutig beweisen, daß eine Mutation des *MYO4*-Gens in einer Minderung der Transkriptionsaktivität des *PCL5*-Promotor-Luziferase Fusionsgens resultiert. Interessanterweise ist die verminderte Transkriptionsaktivität diploidspezifisch, wie auch durch Northernblot-Analyse gezeigt wurde. Eine Ploidie-spezifische Regulation der Gen-Expression ist nicht außergewöhnlich, wenn man bedenkt daß

es sich bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* um einen Organismus mit einem sexuellen Lebenszyklus handelt. Die Zellen können je nach Gegebenheit zwischen einer haploiden und diploiden Vegetationsform wechseln. Die Zellen, die sich in ihrer Ploidie unterscheiden, zeigen auch unterschiedliche Charakteristiken in ihrer Morphologie, Entwicklung und Physiologie. Die Größe einer Zelle nimmt mit steigender Ploidie zu. Die Relation von Größe und Ploidie kann damit erklärt werden, daß die G1 Cycline Cln1 und Pcl1 reprimiert werden, wenn die Ploidie zunimmt. Eine niedrige Genexpression der G1 Cycline hat zu Folge, daß die Zellen den Kontrollpunkt START größer passieren, als das der Fall ist bei einer höheren Genexpression der G1 Cycline (Galitski, Saldanha et al. 1999). Es ist also nicht verwunderlich, daß die Transkription von *PCL5* diploidspezifisch reguliert wird, da es sich hier um ein Gen mit Transkriptionsmaximum in G1 handelt, welches scheinbar in Prozesse verwickelt ist, die die Morphologie, den Metabolismus und die Differenzierung der Hefezelle betreffen.

3.4 *PCL5*, ein Asymmetrie-Erzeuger ?

Die intrazelluläre Lokalisation eines Cyclins oder eines Komplexes aus Cyclin und Cyclin-abhängiger Kinase (CDK) ist oftmals gekoppelt mit seiner temporalen Aktivitätsregulation. Die CDK Pho85p ist wie viele CDKs im Zellkern lokalisiert (Pries, Bomeke et al. 2002). Wir sind davon ausgegangen, daß ihr Cyclin zumindest zu dem Zeitpunkt, wenn Pho85 und Pcl5 einen Komplex bilden, sich ebenfalls im Zellkern befindet. Wir waren nicht in der Lage, Pcl5p unter seinem endogenen Promotor im Westernblot oder in der Immunfluoreszenz zu detektieren, möglicherweise weil es sich um ein nicht sehr abundantes Protein handelt. Mit Hilfe des induzierbaren GAL-Promotors konnten wir jedoch eine Zellkernlokalisierung von Pcl5p bestätigen. In spät-mitotischen haploiden und diploiden Wildtyp-Zellen ist Pcl5 Protein asymmetrisch auf den Zellkern der Mutterzelle verteilt. In diploiden Zellen, die eine Mutation im Gen des Transkriptionsfaktors *ASH1* besitzen, wird das Fusions-Protein GAL-Pcl5p nicht mehr asymmetrisch auf den Zellkern der Mutterzelle verteilt. Pcl5p befindet sich in beiden Zellkernen, dem der Mutter und der Tochter spätmitotischer Zellen. Eine solche symmetrische Verteilung des GAL-Pcl5 Fusions-Proteins kann nicht der Tatsache zu Grunde liegen, daß es sich bei Ash1p um den Transkriptionsfaktor des Cyclins Pcl5 handelt. Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression eines Gens, indem sie an Regionen in dessen Promotor binden, um folgend die Transkription zu aktivieren oder reprimieren. Hier handelt es sich jedoch um ein

Protein, welches nicht mehr unter der Kontrolle seines endogenen Promotors steht. Ash1p muß also neben der Aufgabe, die Transkription von *PCL5* zu regulieren noch eine weitere Funktion besitzen. Entweder *ASH1* reguliert Faktoren, die notwendig sind für die asymmetrische Verteilung von Pcl5p oder *ASH1* reguliert Faktoren, die in der Degradation des Pcl5-Proteins in der Tochterzelle involviert sind. Ist Ash1p nicht mehr vorhanden oder nicht mehr funktionell, so wird entweder die asymmetrische Lokalisation nicht mehr veranlasst oder das Signal für die Degradation im Zellkern der Tochterzelle ist nicht mehr vorhanden. Pcl5p wird in diesem Fall symmetrisch verteilt vorzufinden sein. Ist in diploiden Zellen das Myosin *MYO4* deletiert, wird der Transkriptionsfaktor *ASH1* nicht mehr asymmetrisch lokalisiert und das Protein Pcl5 ist nicht mehr detektierbar. Ich konnte keine Signale in der Immunfluoreszenz detektieren und die Signale im Westernblot waren deutlich geringer im Vergleich zum Wildtyp. Für diese Beobachtung gibt es mehrere Erklärungen. Zunächst kann nicht die eingeschränkte Genexpression dafür verantwortlich sein, da es sich hier um ein Fusions-Gen (*GAL-PCL5*) handelt, welches unter dem induzierbaren *GAL*-Promotor und nicht mehr unter seinem eigenen Promotor steht. Myo4p transportiert die mRNA des Transkriptionsfaktors *ASH1* in die Tochterzelle und folglich ist Ash1p asymmetrisch auf den Tochterzellkern verteilt, wo es möglicherweise die Degradation des Cyclins Pcl5p veranlasst. Ist Myo4p nicht mehr funktionell, befindet sich Ash1p auch im Zellkern der Mutter und könnte auch hier die Degradation von Pcl5p bewirken, was zur Folge hat, daß Pcl5p in beiden Zellkernen abgebaut wird und nicht detektiert werden kann. Nicht auszuschließen ist, daß Myo4p am Transport eines in der Degradation oder Stabilisierung von Pcl5p involvierten Faktors beteiligt ist, was ebenfalls zur Folge hätte, daß Pcl5p sowohl im Tochter- als auch im Mutter-Zellkern abgebaut wird.

Die Stabilisierung bzw. Degradation von Pcl5p ist diploidspezifisch abhängig vom Myosin Myo4p und dem Transkriptionsfaktor Ash1p. In haploiden Zellen beeinflussen Mutationen in den Genen *MYO4* oder *ASH1* nicht die asymmetrische Verteilung des Cyclins Pcl5. Weder *MYO4* noch *ASH1* werden ploidi-spezifisch reguliert. Das legt die Vermutung nahe, daß noch weitere ploidi-spezifische Faktoren an der Regulation des Cyclins *PCL5* beteiligt sind. Inwieweit eine Lokalisation der *PCL5* mRNA in der asymmetrischen Verteilung des Pcl5 Proteins verwickelt ist, konnten wir bislang nicht zeigen. Eine in-situ-Hybridisierung mit DIG-gekoppelten *PCL5*-Gegenstrang-Transkripten war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Eine Aussage, ob die *PCL5* mRNA lokalisiert wird, kann somit nicht getroffen werden.

Ich konnte zeigen, daß *ASH1* notwendig ist für die asymmetrische Verteilung des Cyclins Pcl5 in diploiden Hefezellen. McBride et al. machte eine auf den ersten Blick gegensätzliche Entdeckung, nämlich daß die Cyclin-abhängige Kinase Pho85p erforderlich ist für die asymmetrische Verteilung von Ash1p (McBride, Sil et al. 2001). In einem haploiden *pho85Δ* Stamm wird Ash1p im Mutterzellkern mislokalisiert. Der Grund dieser symmetrischen Verteilung von Ash1p ist eine Stabilisierung des Proteins. Welches der 10 Pho85-Cycline (Pcls) für die Stabilisierung verantwortlich ist, konnte bislang nicht gezeigt werden. *In vitro*-Daten von McBride deuten zwar darauf hin, daß ein Pho80-Pho85 Komplex in der Lage ist, Ash1p zu phosphorylieren, ob jedoch diese Spezifität auch *in vivo* erhalten bleibt ist fraglich. Meine *in vivo*-Daten geben den Hinweis, daß ein Pcl5-Pho85 Komplex möglicherweise an der Stabilisierung von Ash1p beteiligt ist. In einem haploiden *pcl5Δ* Stamm ist Ash1p nur noch in 39% der Postanaphase-Zellen asymmetrisch verteilt. In Wildtypzellen ist Ash1p dagegen in 66% der Postanaphase-Zellen asymmetrisch verteilt. McBride konnte sehen, daß in *pho85Δ* nur noch in 30% der Postanaphase-Zellen eine korrekte Verteilung des Ash1-Proteins erfolgt. Eine Mutation in einem der *SHE* Gene führt zu einer Mislokalisierung von Ash1p als Folge der delokalisierten *ASH1* mRNA. Eine *pho85* Mutation führt zwar ebenso zu einer symmetrischen Verteilung des Ash1 Proteins, jedoch nicht auf Grund der mislokalisierten mRNA. Der Transport oder die Verankerung der *ASH1* mRNA ist in einer *pho85* Mutante nur minimal gestört (McBride, Sil et al. 2001). Ist die Ursache der symmetrischen Verteilung von Ash1p in *pcl5Δ* Zellen, ebenfalls eine Stabilisierung des Ash1 Proteins oder eine Mislokalisierung der *ASH1* mRNA? Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte ich zeigen, daß im Gegensatz zur CDK Pho85, Pcl5 nicht nur einen Effekt auf die Lokalisation des Ash1 Proteins hat, sondern auch auf die Lokalisation der korrespondierenden mRNA. Nur 24% der *pcl5Δ* Zellen zeigen eine Lokalisation der *ASH1* mRNA. Im Vergleich ist die *ASH1* mRNA in 66% der Wildtypzellen lokalisiert. Ich konnte ausschließen, daß eine fehlende Lokalisation des für den Transport der mRNA notwendigen Myosins Myo4 die Ursache der Mislokalisierung der *ASH1* mRNA ist. In *pcl5Δ* Zellen wird Myo4 genauso wie in Wildtypzellen an die Spitze der Tochterzelle lokalisiert, nicht jedoch *ASH1* mRNA. Möglicherweise ist *PCL5* an der Verankerung der mRNA beteiligt. Eine weitere Vermutung ist, daß Pcl5 eine Signalkaskade auslöst, welche den Transport oder die Beladung des Transportpartikels mit mRNA startet. Ich konnte durch Northernblotanalyse ausschließen, daß *PCL5* einen Einfluß auf die Stabilität oder die Transkription der *ASH1* mRNA hat.

Bei einem Genom-übergreifenden Screen nach weiteren lokalisierten mRNAs identifizierten Takizawa et al. 11 weitere mRNAs, die mit der Transportmaschinerie der bis dato einzigen

lokalisierten mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*, der *ASH1* mRNA interagieren (Takizawa, DeRisi et al. 2000). Shepard et al. erhöhten die Anzahl der RNAs, die mit der She-Maschinerie interagieren durch eine Kombination aus Immunpräzipitation, DNA-Microarray-Analyse und GFP-RNA Visualisierung auf 22 verschiedene, bislang nicht beschriebene Substrate (Shepard, Gerber et al. 2003). Eine mRNA, die spezifisch in Tochterzellen lokalisiert ist *IST2* mRNA. Es handelt sich hierbei um das Transkript des putativen Ionenkanals Ist2. Die asymmetrische Verteilung des Ist2p an der Plasmamembran der Tochterzelle ist eine Folge der Lokalisation der korrespondierenden mRNA an die Knospenspitze der Tochterzelle mit Hilfe der She Proteine. Ich konnte zeigen, daß eine Mutation im *PCL5* Gen, nicht nur die Asymmetrie des Transkriptionsfaktors Ash1p zerstört, sondern auch die Asymmetrie des putativen Ionenkanals Ist2p zerstört. Die Deletion des Cyclins *PCL5* zeigt im gleichen Maße wie eine Deletion des *SHE2* Genes eine Mislokalisierung des Ist2 Proteins. Die symmetrische Verteilung von Ist2p in *pcl5Δ* Zellen ist eine Folge der Mislokalisierung der *IST2* mRNA, wie ich durch in-situ Hybridisierung beweisen konnte. Zeigen konnte ich ferner, daß die fehlenden *IST2* mRNA-Signale an der Knospenspitze der *pcl5Δ* Zellen, nicht durch eine Destabilisierung der mRNA oder eine eingeschränkte Transkription herrühren. Eine Northernblotanalyse ergab eine gleiche Expressionsstärke von *IST2* in *pcl5Δ* und Wildtypzellen.

PCL5 ist essentiell für die Asymmetrie der Proteine Ash1 und Ist2, auf Grund der Lokalisation der korrespondierenden mRNAs in die Tochterzelle. Ob ein Komplex aus der CDK Pho85 und dem Cyclin Pcl5 zusätzlich auch einen Einfluß auf die Stabilität der Proteine Ash1 oder Ist2 hat ist bislang nicht bewiesen.

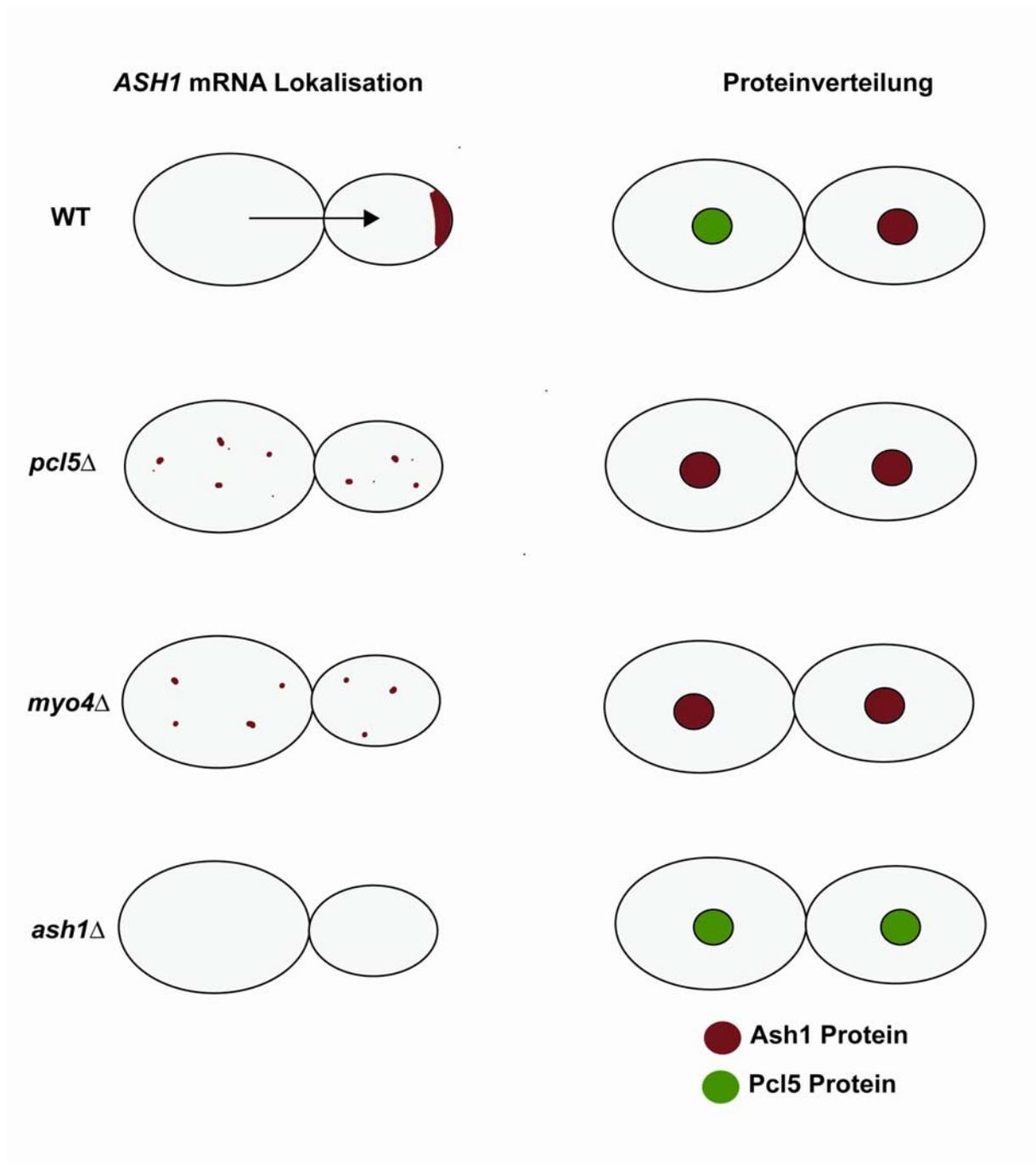


Abb. 3-1 Die Verteilung von Ash1 und Pcl5 Protein. Auf Grund der *ASH1* mRNA Lokalisation ist Ash1p asymmetrisch verteilt (rot). Pcl5p zeigt in Wildtypzellen ebenfalls eine asymmetrische Verteilung (grün). In *pcl5Δ* Zellen wird *ASH1* mRNA nicht mehr lokalisiert und Ash1p ist folglich symmetrisch verteilt. Die gleiche symmetrische Verteilung von Ash1p ist in *myo4Δ* Zellen zu beobachten. In einem *ash1Δ* Stamm befindet sich Pcl5p symmetrisch verteilt, möglicherweise weil ohne Ash1p im Zellkern der Tochter die Degradation von Pcl5p nicht veranlasst wird.

3.5 Ein Modell für die Asymmetrie in *Saccharomyces cerevisiae*

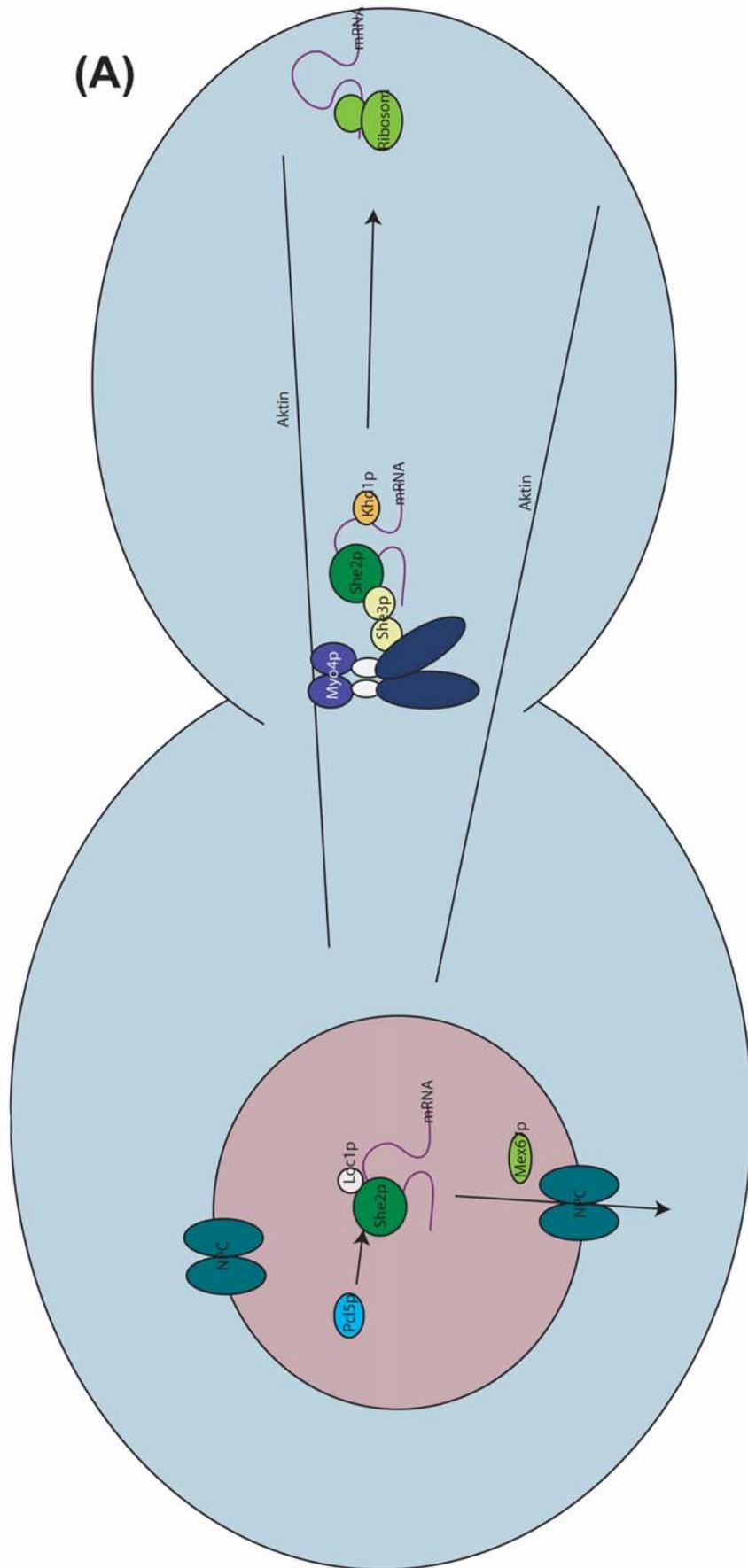
Basierend auf früheren Resultaten und den Daten dieser Arbeit lässt sich das Modell für den mRNA-Transport und die Entstehung der Asymmetrie in *Saccharomyces cerevisiae* erweitern.

Im Kern der Mutterzelle bindet She2p spezifisch an die 4 Lokalisationselemente im *ASH1*-Transkript. Loc1p erleichtert entweder die mRNA Faltung oder assistiert She2p und initiiert somit die Aggregation eines RNP-Partikels (Long, Gu et al. 2001). Pcl5p könnte möglicherweise der Signalgeber für die Formation der *ASH1*-mRNA und *IST2*-mRNA RNP-Komplexe sein. Abhängig von Mex67p wird der She2p-RNP-Komplex über Kernporen ins Zytoplasma exportiert (Kruse, Jaedicke et al. 2002). Der zweite Schritt des Lokalisationsweges ist die Bindung des RNP-Komplexes an den Prätransportkomplex aus Myo4p und She3p im Zytoplasma. She3p hat die Eigenschaften eines Adapters und interagiert mit seinem C-Terminus mit She2p. Der aminoternale Bereich von She3p, der vermutlich eine coiled-coil-Domäne ausbildet, interagiert mit der Schwanzregion des Transportmoleküls Myo4p (Bohl, Kruse et al. 2000). Die mRNA wird durch den Transportkomplex, das sogenannte „Locasom“, an den auch weitere bislang unbekannte Komponenten binden könnten, Aktin-abhängig in die Tochterzelle transportiert und dort an die Knospenspitze verankert. Dem Protein She4 kann in diesem Prozess nur eine indirekte Rolle zugeschrieben werden. In *she4* Mutanten ist die Aktinpolarisation gestört, außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, daß She4p notwendig für Funktion und Lokalisation verschiedener Myosine der Klasse I und V ist (Toi, Fujimura-Kamada et al. 2003; Wesche, Arnold et al. 2003). Mutationen in *BUD6/AIP3* und *BNII/SHE5* zeigen ebenfalls eine fehlerhafte Aktinpolarisation. Obwohl das Aktinzytoskelett in beiden Fällen Störungen aufweist, reicht der Effekt jedoch nicht aus, um den gerichteten Transport zu unterbrechen. Vielmehr wird eine Verankerung der mRNA vermindert oder komplett verhindert (Beach, Salmon et al. 1999; Beach and Bloom 2001). Ein genauer Mechanismus für die Verankerung der lokalisierten mRNAs ist bisher nicht identifiziert worden. Die Translation der *ASH1* mRNA scheint eine essentielle Rolle bei der Verankerung zu spielen. Das Einfügen vorzeitiger Stopkodons in den C-Terminus der Ash1p codierenden Sequenz, unterbindet eine feste Verankerung der mRNA an die kortikale Spitze (Gonzalez, Buonomo et al. 1999). Passend hierzu lokalisiert die *ASH1* mRNA nicht mehr in Zellen, die Mutationen im Polysomen-assoziierten, RNA-bindenden Protein Scp160 besitzen (nicht publizierte Daten, Dunja Ferring). Die Überexpression des RNA-bindenden Proteins Khd1p inhibiert die Translation der *ASH1* mRNA und führt ebenfalls zu einer Delokalisation der mRNA. Khd1p bindet direkt

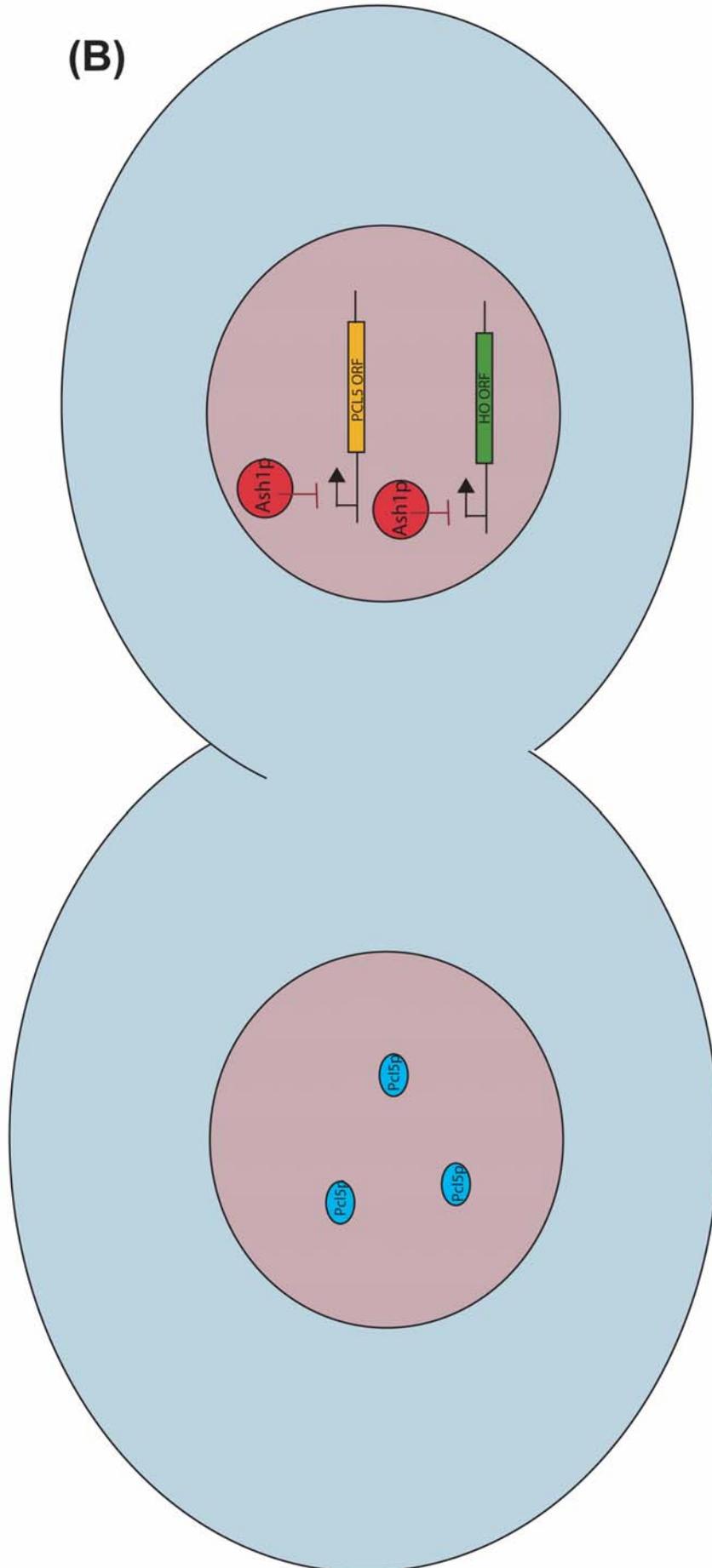
an das E1-Lokalisationselement der *ASH1* mRNA (Irie, Tadauchi et al. 2002). Da angenommen wird, daß die *ASH1* mRNA am distalen Ende der Knospe translatiert wird und dann in den proximalen Tochterzellkern transportiert wird, könnte die Aufgabe von Khd1p darin bestehen, die Translation während des Transports der mRNA zu inhibieren.

Im Zellkern der Tochter erfüllt Ash1p seine Aufgabe nur zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zellzyklus. Ash1p verhindert den Paarungstypwechsel in der Tochterzelle in der späten G1-Phase. Nach Vollendung dieser Aufgabe muß Ash1p zerstört werden, damit die Hefezelle im nächsten Zellzyklus in der Lage sein wird, den Paarungstyp zu wechseln. Erste Einblicke in die Regulation der Ash1p Degradation lieferten McBride und Kollegen. In einer *pho85* Mutante ist Ash1p nicht nur im Mutterzellkern mislokalisiert, sondern auch stabilisiert (McBride, Sil et al. 2001). Welches der Pho85 Cycline Für die Stabilisation des Ash1 Proteins verantwortlich ist konnte bislang noch nicht eindeutig bewiesen werden. Meine *in vivo* Daten lassen vermuten, daß ein Komplex aus Pcl5 und Pho85 eine Rolle in der Degradation von Ash1p spielt. Mutationen in *PCL5* führen zu mislokalisiertem Ash1p. Allerdings wird auch die *ASH1* mRNA in *pcl5Δ* Zellen mislokalisiert. Wir vermuten, daß Pcl5p nicht nur das Signal gibt, um das „Locasom“ mit *ASH1* und *IST2* mRNA zu beladen, sondern auch eine Rolle in der Stabilisierung oder Degradation der Ash1 und Ist2 Proteine spielt. Desweiteren schlagen wir vor, daß es sich hier um einen Feedback Regulations Mechanismus handelt. Die zweite Aufgabe von Ash1p im Zellkern der Tochter, neben der Verhinderung des Paarungstypwechsels, ist es die Transkription des Cyclins *PCL5* zu inhibieren und die Degradation von Pcl5p im Tochterzellkern zu aktivieren. In *ash1* Deletionsmutanten befindet sich Pcl5 Protein symmetrisch auf die Zellkerne der Mutter und Tochter verteilt. In Wildtypzellen, die sich in der späten G1-Phase befinden, ist Ash1p im Zellkern der Tochter lokalisiert, während Pcl5 Protein sich ausschließlich im Zellkern der Mutter befindet. Wird Ash1p durch einen fehlenden Transport der mRNA in *myo4Δ* Zellen symmetrisch auf beide Zellkerne verteilt, hat dies zur Folge, daß Pcl5 Protein nicht detektiert werden kann.

Abb. 3-2 Hypothetisches Modell zur mRNA Lokalisation (A) und Transkriptionskontrolle durch Ash1p (B). (A): Im Zellkern formiert sich ein RNP bestehend aus She2p und mRNA mit Hilfe von Loc1p. Möglicherweise gibt Pcl5p das Signal zur Formation des RNP. Abhängig von Mex67p wird der RNP-Komplex über die Kernporen (NPC, nuclear pore complex) ins Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma bindet der RNP Komplex an den She3p/Myo4p-Prätransportkomplex und wird entlang von Aktinkabeln an die Spitze der Tochterzelle transportiert. Khd1p bindet an das E1-Lokalisationselement der *ASH1* mRNA und inhibiert so möglicherweise die Translation der mRNA während des Transports. An der Knospenspitze wird die *ASH1* mRNA schließlich translationsabhängig verankert. (B): Im Zellkern der Tochter inhibiert Ash1p die Transkription von *HO* und *PCL5*. Möglicherweise verursacht Ash1p die Degradation von Pcl5p im Zellkern der Tochter. Folglich ist Pcl5p asymmetrisch im Zellkern der Mutter angereichert.



(B)



3.6 Zukünftige Aufgaben

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich ein bereits postuliertes Modell für den mRNA-Transport und die Entstehung der Asymmetrie in sich teilenden Hefezellen um einen interessanten Aspekt erweitern. Zur Verifizierung dieses Modells bedarf es in weiten Teilen einer genaueren Untersuchung.

Zukünftige Experimente werden zeigen müssen, zu welchem Zeitpunkt bzw. in welchem Lokalisationsschritt der *ASH1* und *IST2* mRNA das Cyclin *PCL5* eine Rolle spielt. Ein erneuter Screen nach Mutanten mit Defekten in der Lokalisation von Ash1p, Ist2p und *ASH1*, *IST2* mRNA könnte Rückschlüsse erbringen, welche weiteren Faktoren daran beteiligt sind. Koimmunpräzipitationen mit Pcl5 und den Komponenten des Transports könnten klären ob Pcl5 zu einer direkten Interaktion mit den Transportkomponenten in der Lage ist. Eine Microarrayanalyse mit *pcl5Δ* Zellen versus Wildtyp Zellen könnte Hinweise darauf geben, welche Signaltransduktionswege das Signal „mRNA in die Tochterzelle transportieren“ auslösen.

Da wir davon ausgehen, daß *PCL5* nicht nur eine Rolle in der Lokalisation der *ASH1* und *IST2* mRNAs spielt, sondern auch möglicherweise im Komplex mit der Cyclin-abhängigen Kinase Pho85 eine Funktion in der Degradation der korrespondierenden Proteine hat, müssen Stabilisationsexperimente gemacht werden. Diese könnten mit Hilfe von Epitop-markierten Proteinen unter der Kontrolle eines reprimierbaren GAL1 Promotors schnell zu einer Antwort führen.

Meine *in vivo* Daten sollten desweiteren durch *in vitro* Experimente bestätigt werden. Es ist unabdingbar, einen Pcl5-Pho85 Komplex zu isolieren, um mit gereinigten GST-Ash1 und GST-Ist2 und radioaktiv markiertem ATP Phosphorylierungsstudien durchzuführen. Sofern ein solcher Komplex in der Lage ist, Ash1 und/oder Ist2 zu phosphorylieren könnten wir sicher sagen, daß es sich um Substrate der Pho85 Kinase handelt und Pcl5 das spezifische Cyclin ist.

Die wohl schwierigste Aufgabe wird es sein, die She2-unabhängige Regulierung der *PCL5* Transkription zu klären. Eine She2-unabhängige Regulation legt nahe, daß die gestörte Asymmetrie von Ash1p nicht alleine der Auslöser für eine niedrigere Transkriptionsrate von *PCL5* unter Stressbedingungen sein kann. Zu überprüfen, ob die Regulation von She3, She4 oder She5/Bni1 abhängig ist, könnte eine Antwort geben, inwieweit die Lokalisation des Myosins Myo4 eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang ist es notwendig zu klären, welche Rolle der She2-unabhängige Transport des kortikalen ERs über Myo4p spielt. Werden hier auch Faktoren transportiert, die eine Funktion in der Regulation der *PCL5* Transkription

spielen oder ist die korrekte Vererbung des kortikalen ERs notwendig für die *PCL5* Transkriptionsregulation?

Ich konnte zeigen, daß eine Mutation in *PCL5* eine bessere Adaption an Stressbedingungen, die die Versorgung der Zelle mit Nährstoffen betreffen, ermöglicht. Dies ist spezifisch für den Mangel an Aminosäuren und Stickstoff, jedoch unabhängig vom Glucosevorrat. Diese Spezifität ist genauer zu definieren, da Pcl5 im Regulationsmechanismus des Transkriptionsfaktors Gcn4 involviert ist. Gcn4p ist verantwortlich für das Überleben der Hefezellen, wenn nicht ausreichend Aminosäuren und Purine zur Verfügung stehen. Um einen Aminosäuremangel zu simulieren, der zu einer Erhöhung der *GCN4* Transkriptionsrate führt muß dem Medium 3-Aminotriazol zugeführt werden. Ist es eine von *GCN4* gesteuerte Anpassung an Stressbedingungen, könnte dies dadurch geklärt werden.

Da es sich hier um eine Ploidie-spezifische Regulation handelt, sollte ein zukünftiges Ziel sein, durch Mutantanalyse zu klären welche weiteren Faktoren diese Eigenheit hervorrufen. Eine Basis für weitere Untersuchungen betreffend der Rolle von Ash1p in Differenzierungsprozesse und Zellmorphologie hat der Phänotyp einer *ash1/pcl5* Doppelmutante geschaffen.

Ich konnte in dieser Arbeit einen Grundstein legen für eine Vielzahl von Untersuchungen um die neuen Funktionen und Aufgaben des Transkriptionsfaktors Ash1 zu klären. Durch die hier gezeigte neue Ash1p Funktion, neben der Rolle im Paarungstypwechsel wird auch deutlich welche Dringlichkeit weitere Untersuchungen des *Candida albicans* *ASH1* Homolog in *Candida albicans* haben. Homologievergleiche zeigten, daß alle Mitglieder der *S.cerevisiae* Transportmaschinerie, mit Ausnahme von *SHE2*, in *C.albicans* zu finden sind. Da es sich hier jedoch lediglich um Sequenzhomologien handelt, bleibt die Frage noch zu beantworten ob der mRNA Transport ohne *SHE2* bewerkstelligt wird oder ob ein anderes Protein die *SHE2* Funktion in *C.albicans* übernimmt.

Nicht nur, daß zukünftige Experimente klarlegen müssen inwieweit der komplette mRNA Transport in *Candida albicans* konserviert ist, anschließend könnten auch Versuche die die neue Rolle von Ash1p beinhalten, eine medizinische Relevanz zeigen.

4 Material

4.1 Oligonukleotid-Primer

4.1.1 Primer für Gendisruptionen und Verifizierung der Gendisruptionen

Name	Sequenz: 5' → 3'
RJO88	ATGATCGATTATTTACTTTGTTCTTA
RJO106	GGATACAGTTCTCAC
RJO116	TTTGAATTCCAAAGTTTGGCTGC
RJO161	TTTTCTGCAGATGACCACATATTCTGCT
RJO184	CCAGTTTGGCGAGACAATTTATTTTCAATACGATACCCCAGCTGAAG CTTCGTAC
RJO185	CAGCTTCGCCCTTGTTAGCAGGCTTGTATTTCAACGCATAGGCCACT AGTGGATCTG
RJO195	TTTCCAAGCTGAAGACGTTACAA
RJO502	CCTTAGAGCAACAACGGTACTCATCATCAGACAAATTCAAGTTTCTT TCTCCC
RJO503	CGTCATATGGAATGGCCAGCTCATAATTCAGCTTACCCGGAACGAC ATTCAC
RJO552	GCAGGGCCCCTCCTTACGCATCTGTGCGGT
RJO565	ACATTGAGGGTTGTTCCCTTCAAGCAACTACCCCACGCCCAAGTTTCT TTCTCCC
RJO566	TTGACTCATGATCTGTTCCAGATCCCAACTTTGCCTGTTGGAACGAT CATTCAC
RJO567	CTGCTCAAGTCGCCAGTAACG
RJO568	GATCTGATAGGACTCGTGCCAGC
RJO663	GGTATCATTTGTGTTCCCGG
RJO992	CAGCTTCGCCCTTGTTAGCAGGCTTGTATTTCAACGCATAGGCCACG TGGATCTG

4.1.2 Primer für Epitop-Fusionen

Name	Sequenz: 5' → 3'
RJO543	GACAATGATTATGATGCAAATTCTTGGAAACAGATTAAATCTTGT CGTACGCTGCAGGTCGAC
RJO544	AAAGTTAATTTATTGATGAATGAAAGATATATAACATTTTCGAAA ATCGATGAATTCGAGCTCG
RJO547	TATGTATATATACATATATACATATATGGGCGTATATTTACTTTGTT CATCGATGAATTCGAGCTCC
RJO548	ACAGAGGGCTTAGCTACTGTCAGTAAAATTATAAAAATTAGACAG AAAACGTACGCTGCAGGTCGAC
RJO1177	GGGAGCTTCCAATGTAGTGTAGG
RJO1256	TTTTTCTAGAATGGATGGAAATCATAGGTTTACTCCAGATTCC
RJO1257	TTTTGCATGCCGGATCTGCCGGTAGAGGTGTGGTC
RJO1318	TTTTAAGCTTCGGATCTGCCGGTAGAGGTGTGGTC

4.1.3 Primer für Northernblot-Sonden

Name	Sequenz: 5' → 3'
RJO321	CTGCCAATGCTTGCTGCTT
RJO322	TCCCTAGAGGCAAAACCTTG
RJO486	TCCACTGGCAGAAATCCGTAT
RJO487	ATTCTCTGGGTCTCTTCACCG
RJO492	TCGTCATCAATGCTAAACCG
RJO493	TATTTATGGTCCCAGTTGGCG
RJO512	GACTATTCACACTAACGGTGC

4.1.4 Primer für die *in vitro* Transkription

Name	Sequenz: 5' → 3'
RJO671	CTATACTTATTTGCACG
RJO672	GGAAAGCTGTGCTTTATAG
RJO673	CAGCCTGCCTCTTCTGCC

RJO674	CGATGCTGCCACTAAG
RJO675	TAATACGACTCACTATAGGGGCCAATATTGAAAAGGC
RJO676	TAATACGACTCACTATAGGCCACGAGTGGTTTATTG
RJO677	TAATACGACTCACTATAGGCCGCAACACCATATGAG
RJO678	TAATACGACTCACTATAGGGTGATGATGATGGTGGGGC

4.1.5 Primer für Sequenzierungen

Name	Sequenz: 5' → 3'
RJO520	ATTTTACGTGCGCCGCCCT
RJO957	GATGCGCGCAATAGAAGAC
RJO958	GATCAAAAGCTCAGCAAGG

4.1.6 Primer für Klonierung des *PCL5* Promotors vor das Luziferase-Gen

Name	Sequenz: 5' → 3'
RJO1240	TTTTTTAAGCTTGATGCGTCATACTACTTGAATACAACACAACCC GTC
RJO1241	CACCTCTAGAGGATCCATCCATGGTTATTTTTATTTTC

4.2 Vektoren und Plasmide

4.2.1 Vektoren

pGEM-3z	(Promega)
pBluescript II KS	(Stratagene)
pUC19	(Stratagene)
p41x-GAL1 Serie	(Mumberg et al. 1995)
YCplac Serie	(Gietz und Sugino, 1988)
YEplac Serie	(Gietz und Sugino, 1988)
pYM Serie	(Knop et al., 1999)
pSL1180	(Pharmacia)

4.2.2 Plasmide

pRJ12	YCplac111- <i>MYO4</i> , 6,5kb <i>MYO4/SHE1</i> plus 5` flankierende Region
pRJ44	YCplac111 (<i>LEU2</i>) <i>ash1::URA3</i> Insertion
pRJ46	YCplac111 (<i>LEU2</i>) <i>ASH1-MYC9</i>
pRJ52	YEplac181, 2,5kb vor dem <i>ASH1</i> ATG, <i>ASH1-MYC9</i> ORF und 1,5kb nach Stop
pRJ88	YEplac181- <i>ASH1</i> , <i>ASH1</i> mit 1,65kb vor dem ATG und 1,1kb nach dem Stop mit SacI/SalI in YEplac181 (<i>LEU2</i>)
pRJ111	p413- <i>GAL1</i> (<i>HIS3</i>)
pRJ114	p416- <i>GAL1</i> (<i>URA3</i>)
pRJ123	YCplac33 <i>GAL1-10</i>
pRJ126	<i>HA3-K.lactis TRP1</i> in pUC19 (Wolfgang Zachariae)
pRJ135	pFA6a- <i>HIS3MX6</i> (<i>S.pombe HIS3</i> für Gendisruptionen)
pRJ138	YCplac22 (<i>TRP</i>)
pRJ139	YCplac33 (<i>URA3</i>)
pRJ140	YIplac128 (<i>LEU2</i>)
pRJ143	YEplac181 (<i>LEU2</i>)
pRJ144	YEplac112 (<i>TRP</i>)
pRJ145	YCplac111 (<i>LEU2</i>)
pRJ146	pRS303 (<i>HIS3</i>)
pRJ152	YEp13 Klon, <i>HO</i> komplett + 5` flankierende Sequenz
pRJ297	pRS315 (<i>LEU2</i>)
pRJ298	pRS315- <i>ASH1</i> (Andreas Jaedicke)
pRJ343	YEplac195- <i>CaASH1</i> , 6kb BamHI Insert aus <i>C.albicans</i> Genom, enthält die 1,9kb <i>CaASH</i> codierende Sequenz
pRJ409	YCplac33- <i>PCL5</i> , Triple-Klonierung: 500bp vor Start <i>PCL5</i> plus neuer PstI-site und neue BamHI-site am Start kloniert mit 1000bp Fragment mit neuer BamHI-site am Start und neuer KpnI-site 300bp nach Stop.
pRJ413	YEplac195 (<i>URA3</i>)
pRJ577	pRS426- <i>IST2</i> (<i>URA3</i>) von Christof Jüschke (PCJ15)
pRJ713	pUHC131-1 Luciferase ORF von Kai Schönig (Gossen&Bujard, 1992)
pCJ79	pRS303 (<i>HIS3</i>) <i>GAL-YFP-IST2</i> (Christof Jüschke)

4.2.3 Für diese Arbeit erzeugte Plasmide

pRJ355	YEplac195- <i>CaASH1</i> , 2,5kb PstI Fragment aus pRJ343
pRJ357	pRS315- <i>CaASH1</i> , 2,5kb PstI Fragment aus pRJ343
pRJ380	YEplac181- <i>PCL5</i> , <i>PCL5</i> (1300bp) PCR-amplifiziert mit neuer Sall Schnittstelle 500bp vor Start und neuer XbaI Schnittstelle 50bp nach Stop
pRJ589	YCplac22- <i>MYO4</i> , BamHI/PstI 8kb <i>MYO4</i> Fragment aus pRJ12 in YCplac22
pRJ590	YCplac111- <i>myo4</i> frameshift, pRJ12 XhoI geschnitten, Klenow, religiert und <i>myo4</i> frameshift überprüft
pRJ591	YCplac22- <i>myo4</i> frameshift, <i>myo4</i> frameshift BamHI/PstI Fragment aus pRJ590
pRJ714	YCplac22- <i>PCL5</i> -Promotor-Luciferase, <i>PCL5</i> Promotor PCR-amplifiziert (RJO1240, RJO1241), HindIII/NcoI geschnitten, 1,7kb NcoI/XbaI Luciferase-Fragment aus pRJ713 in HindIII/XbaI geschnittenen YCplac22-Vektor kloniert.
pRJ720	YEplac195- <i>PCL5</i> , Sall/XbaI 1,3Kb Fragment aus pRJ380 in YEplac195
pRJ781	p416- <i>GAL1-PCL5-3xHA</i> , HindIII/XbaI PCR-Produkt
pRJ799	p413- <i>GAL1-PCL5-3xHA</i> , XbaI/XhoI Fragment aus pRJ781 in p413- <i>GAL1</i>

4.3 Bakterien- und Hefestämme

4.3.1 Bakterienstämme

E.coli XL1-blue (Stratagene)

E.coli TOP10

E.coli DH5 α

4.3.2 Hefestämme

RJY499 *Mat a*, *trp1::hisG*, *his3::hisG*, Sigma-Stamm (H.U. Mösch)

RJY500 *Mat alpha*, *trp1::hisG*, *his3::hisG*, Sigma-Stamm (H.U. Mösch)

RJY501 *Mat a*, *ura3-52*, *his3::hisG*, *trp1::hisG*, Sigma-Stamm (H.U. Mösch)

RJY502 *Mat alpha*, *ura3-52*, *his3::hisG*, *trp1::hisG*, Sigma-Stamm (H.U. Mösch)

RJY503 *Mat a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, Sigma-Stamm (H.U. Mösch)*

RJY504 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, Sigma-Stamm (H.U. Mösch)*

RJY521 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG myo4::s.p.HIS3*

RJY522 *Mat alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG myo4::s.p.HIS3*

RJY526 *Mat alpha, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his 3-11,15, ura3, ash1::TRP1, myo4::s.p.HIS3*

RJY527 *Mat a, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his 3-11,15, ura3, ash1::TRP1 myo4::s.p.HIS3*

RJY546 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3*

RJY572 *Mat a/alpha,, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his 3-11,15, ura3, ash1::TRP1/ash1::TRP1, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3*

RJY575 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG*

RJY576 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, YEplac112 (TRP)*

RJY579 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3/ash1::URA3, pRJ152*

RJY607 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3, ash1::URA3*

RJY638 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3, myo4::s.p.HIS3*

RJY647 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pRJ152*

RJY648 *Mat a/Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3/ash1::URA3, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, pRJ152*

RJY707 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, myo4::s.p.HIS3*

RJY711 *Mat alpha, Mat a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3*

RJY742 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3 YCplac22 (TRP1), YCplac33 (URA3)*

RJY743 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pRJ152, YCplac33 (URA3), YCplac22 (TRP1), pRS303 (HIS3)*

RJY744 *Mat a/Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3/ash1::URA3, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, pRJ152 YCplac22 (TRP1)*

RJY755 *Mat alpha, Mat a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG*
myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, pRJ152, YCplac22 (TRP1)

RJY839 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pcl5::K.lactisTRP1*

RJY846 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3*
pcl5::K.lactisTRP1

RJY849 *Mat a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pcl5::K.lactisTRP1*

RJY850 *Mat a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::HIS3*

RJY851 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::His3*
pRS315-ASH1 (pRJ298)

RJY852 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG,*
ash1::HIS3/ash1::HIS3, pRS315-ASH1 (pRJ298)

RJY856 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::His3*
pRS315-C.a.ASH1 (pRJ357)

RJY859 *Mat alpha/a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG*
pcl5::K.lactisTRP1/pcl5::K.lactisTRP1, pRJ152

RJY860 *Mat alpha/a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG,*
ash1::URA3/ash1::URA3, pcl5::K.lactisTRP1/pcl5::K.lactisTRP1, pRJ152

RJY861 *Mat alpha/a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG,*
ash1::His3/ash1::His3, pRS315-C.a.ASH1(pRJ357)

RJY862 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3, pcl5::K.lactisTRP1*

RJY863 *Mat alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3,*
pcl5::K.lactisTRP1

RJY864 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3,*
myo4::s.p.HIS3, pcl5::K.lactisTRP1

RJY889 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG,*
ash1::URA3/ash1::URA3

RJY895 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG*
ash1::URA3/ash1::URA3, YCplac22 (TRP1),pRS303 (HIS3), YEplac181-
ASH1 (pRJ88)

RJY896 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG*
ash1::URA3/ash1::URA3, YCplac22 (TRP1), pRS303 (HIS3), YIplac128
(LEU2)

RJY897 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG*
ash1::URA3/ash1::URA3, YCplac22 (TRP1), pRS303 (HIS3), pRS315-ASH1

RJY898 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG
ash1::URA3/ash1::URA3, YCplac22 (TRP1), pRS303 (HIS3), pRS315-
C.a.ASH1*

RJY903 *Mat alpha/Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG,
myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, pcl5::K.lactisTRP1/pcl5::K.lactisTRP1*

RJY904 *Mat alpha/Mat a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG
ash1::URA3/ ash1::URA3, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3
pcl5::K.lactisTRP1/pcl5::K.lactisTRP1*

RJY905 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3,
YEplac195-ASH1*

RJY906 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3,
pcl5::K.lactisTRP1, YEplac181-ASH1*

RJY909 *Mat alpha/a, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG,
ash1::URA3/ash1::URA3, pcl5::K.lactisTRP1/pcl5::K.lactisTRP1*

RJY912 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3
pcl1::K.lactis TRP1*

RJY913 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3,
myo4::s.p.HIS3, pcl1::K.lactis TRP1*

RJY917 *Mat a/Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG,
ash1::URA3/ash1::URA3, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3*

RJY980 *Mata, ade2, trp1, leu2, ura3, HO-ADE2, HO-CAN1, ash1-12, myo4:: HIS
YEplac195-ASH1*

RJY981 *Mata, ade2, trp1, leu2, ura3, HO-ADE2, HO-CAN1, ash1-12, myo4:: HIS
YCplac33 (URA3)*

RJY982 *Mata, ade2, trp1, leu2, ura3, HO-ADE2, HO-CAN1, ash1-12, myo4:: HIS
YEplac195-C.a.ASH1*

RJY998 *Mat alpha,ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his 3-11,15, ura3,
ash1::TRP1, YEplac195-ASH1*

RJY999 *Mat alpha,ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his 3-11,15, ura3,
ash1::TRP1, YCplac33 (URA3)*

RJY1000 *Mat alpha,ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3,112, his 3-11,15, ura3,
ash1::TRP1, YEplac195-C.a.ASH1*

RJY1262 *MATalpha/MATa/, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG
YEplac195-ASH1, YEplac181 (LEU2), YCplac22 (TRP1), pRS303 (HIS3)*

RJY1275 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, she2::URA3*

RJY1322 *Mat alpha, Mat a, ura3-52/ura3-52, trp1::hisG/trp1::hisG, leu2::hisG/leu2::hisG, his3::hisG/his3::hisG, she2::URA3/she2::URA3*

RJY1379 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG*
myo4::s.p.HIS3 340bp kürzere Deletionmutante im Vergleich zu RJY521 und RJY707

RJY1412 *Mat alpha, Mat a ura3-52/ura3-52, trp1::hisG/trp1::hisG, leu2::hisG/leu2::hisG, his3::hisG/his3::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, RJY1379* diploid

RJY1422 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG myo4::s.p.HIS3, YCplac22-MYO4*

RJY1423 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, myo4::s.p.HIS3, YCplac22-myo4 frameshift*

RJY1492 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, YCplac111-ASH1-MYC9 (pRJ46)*

RJY1513 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pcl5::K.lactisTRP1, YCplac111-ASH1-MYC9 (pRJ46)*

RJY1567 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, YCplac22-MYO4*

RJY1568 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, YCplac22-myo4 frameshift*

RJY1609 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, YEplac181-ASH*

RJY1610 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pcl5::K.lactisTRP1, YEplac181-ASH*

RJY1687 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3, YEplac195-ASH1*

RJY1688 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, she2::URA3, YEplac181-ASH*

RJY1724 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3, pcl1::K.l.TRP*

RJY1739 *Mat a/ Mat alpha, ura3-52/ura3-52, his3::hisG/his3::hisG, trp1::hisG/trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, pcl1::K.l.TRP/pcl1::K.l.TRP*

RJY1796 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, YCplac22-PCL5promotor-Luciferase, Klon #1*

RJY1797 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, YCplac22-PCL5promotor-Luciferase, Klon #2*

RJY1798 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, YCplac22-PCL5promotor-Luciferase, Klon #1*

RJY1799 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, YCplac22-PCL5promotor-Luciferase, Klon #2*

RJY1810 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, YEplac195-ASH1*

RJY1812 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, YCplac111-PCL5promotor-Luciferase, Klon #1*

RJY1819 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, YCplac111-PCL5promotor-Luciferase, Klon #2*

RJY1820 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3, YCplac22 - PCL5promotor-Luciferase, Klon #1*

RJY1821 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3, YCplac22 - PCL5promotor-Luciferase, Klon #2*

RJY1850 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, Myo4-3xHA*

RJY1853 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pcl5::K.lactisTRP1, Myo4-3xHA*

RJY1877 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, GAL-YFP-IST2 (pCJ79, Christoph Jüschke)*

RJY1889 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pcl5::K.lactisTRP1, GAL-YFP-IST2 (pCJ79, Christoph Jüschke)*

RJY1911 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, she2::URA3, GAL-YFP-IST2 (pCJ79, Christoph Jüschke)*

RJY1921 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, pcl5::K.lactisTRP1, GAL-YFP-IST2 (pCJ79, Christoph Jüschke)*

RJY1925 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, p416 GAL1-PCL53xHA*

RJY1927 *Mat a, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3, p416 GAL1-PCL53xHA*

RJY1929 *Mat a/alpha, ura3-52, his3::hisG, trp1::hisG, myo4::s.p.HIS3/myo4::s.p.HIS3, p416 GAL1-PCL53xHA*

RJY1931 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, p416 GAL1-PCL53xHA*

- RJY1954 *Mat alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3, p413-GAL1 (HIS3)-PCL5-3xHA*
- RJY1956 *Mat a/alpha, ura3-52, trp1::hisG, leu2::hisG, his3::hisG, ash1::URA3/ash1::URA3, p413-GAL1 (HIS3)-PCL5-3xHA*

4.4 Antikörper

12CA5; Maus-Anti-HA	(Field et al.,1988)
9E10; Maus-Anti-Myc	(Evan et al.,1985)
Alexa Fluor ® 488 Kaninchen-Anti-Maus IgG	Molecular Probes
Alexa Fluor ® 488 Kaninchen-Anti-Ratte IgG	Molecular Probes
Alexa Fluor ® 488 Ziege-Anti-Maus IgG	Molecular Probes
Alkalische Phosphatase-konjugierte AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG	Dianova
Alkalische Phosphatase-konjugierte AffiniPure Ziege Anti-Ratte IgG	Dianova
Anti-Digoxigenin	Roche
Anti-GFP (B34)	Covance
Anti-HA (3F10)	Roche
Anti-Hase-IgG-Meerettich-Peroxidase	Amersham
Anti-Maus-IgG-Meerettich-Peroxidase	Amersham
Maus-Anti-Aktin MAB1501R	Chemicon

4.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche
CIP (Calf intestinal phosphatase)	Roche
DNaseI (RNase-frei)	Roche
Klenow-Polymerase	New England Biolabs (NEB)
Lysozym	Biomol
Oxalyticase	Enzogenetics
Platinum [®] Pfx DNA Polymerase	GIBCOBRL
Pfu DNA Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (NEB)

RNA-Polymerase (SP6)	Promega
RNA-Polymerase (T7)	Promega
RNaseA	Roche
RNasin	Promega
RQ1 DNase, RNase-frei	Promega
T4-DNA-Ligase	Roche
<i>Taq</i> DNA Polymerase	MBI Fermentas
Vent DNA Polymerase	New England Biolabs (NEB)
Zymolase 20.000	ICN
Zymolase 100.000	ICN

4.6 Molekularbiologische Baukästen (Kits)

DNeasy [®] Tissue Kit	Qiagen
Nucleobond AX 100 Midiprep Kit	Machery&Nagel
Prime-It [®] II Random Primer Labeling Kit	Stratagene
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs (NEB)
T7-Mega-Shortscript-Kit	Ambion

5 Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Methoden wurden nach allgemeinen oder hefespezifischen Standardverfahren und Standardprotokollen durchgeführt. (Adams et al. 1997; Ausubel et al. 1995; Maniatis et al. 1989). Daher werden im Folgenden lediglich Methoden wiedergegeben, die keine Standardverfahren sind, oder von bereits veröffentlichten Protokollen abweichen. Sofern mit handelsüblichen molekularbiologischen Baukästen (Kits) gearbeitet wurde, werden auch in diesen Fällen nur Abweichungen der dazugehörigen Protokolle beschrieben.

5.1 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Hefekulturen wird im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 600nm gegen Medium gemessen. Die optische Dichte bei 600nm (OD_{600}) von 1 entspricht dabei etwa $2,5 \times 10^7$ Zellen.

5.2 Hefetransformation

Die schnelle Hefetransformation („One step transformation“) wurde nach Chen et al. durchgeführt, während die Hoch-Effizienz-Transformation nach Gietz et al. erfolgte.

5.3 Deletion eines Gens

Für die Disruption des *ASH1*-Gens wurde das EcoRI/EcoRI-Fragment aus Plasmid pRJ44 über ein Agarosegel mit dem Qiagen Gel-Purification Kit aufgereinigt und nach der Methode von Gietz et al. (1995) in die Hefe transformiert. Das *ash1::URA3* Plasmid (pRJ44) wurde durch die Integration des *URA3*-Gens in die NcoI-Schnittstelle der *ASH1* codierenden Sequenz hergestellt. Auf –URA-Selektionsplatten sollten nur die Klone überleben, die durch homologe Rekombination *ash1::URA3* positiv in ihr Genom integriert haben.

Die Verifizierung der Gendisruption erfolgt üblicherweise durch einen sogenannten PCR-Southern. Für die PCR-Analyse wählt man die Primer entweder so, daß eine erfolgreiche Integration durch einen Größenunterschied des amplifizierten Produkts zu erkennen ist, oder man benutzt zwei Primerpaare. Ein Primer hybridisiert im Markergen und der zweite bindet außerhalb der codierenden Sequenz im flankierenden Bereich. Das heißt nur im Falle einer Integration erhält man ein Produkt. Das Wildtyp-Allel wird mit Hilfe eines Primers, der in einer Region hybridisiert, die durch die Disruption nicht mehr vorhanden ist und dem zweiten,

im flankierenden Bereich bindenden Primer amplifiziert. Sofern das Wildtyp-Gen disruptiert ist, erhält man dann kein Produkt.

Für die Disruption des *SHE2*-Gens wird aus dem Genom eines bereits deletierten Hefestammes das *she2::URA3* Fragment mittels PCR amplifiziert und durch homologe Rekombination in den *SHE2*-Locus integriert.

Die Deletion der Gene *MYO4* und *PCL5* wurde mit einer auf PCR basierenden Methode durchgeführt. Hierbei werden Module von heterologen Markergenen wie *S.pombeHIS3MX6* oder *K.lactisTRP1* mit Primern, die jeweils ca. 50 Basen lange homologe Sequenzen zur 5'UTR bzw. 3'UTR des Zielgens aufweisen, durch PCR amplifiziert. Das Produkt wird aufgereinigt, in Hefezellen transformiert und ebenfalls durch homologe Rekombination ins Genom integriert.

5.4 Prinzip der Selektion mit dem Reporter *HO-ADE*

Die Expression der *HO*-Endonuclease läßt sich mit Hilfe der Aktivität eines Reportergenes, *HO-ADE2* verfolgen (Jansen, Dowzer et al. 1996). Dieser Reporter enthält den kompletten *HO* Promotor fusioniert mit der *ADE2* codierenden Sequenz. Vom *ADE2* Gen wird ein Enzym synthetisiert, das einen wichtigen Schritt in der Adenin-Biosynthese darstellt. Bringt man *ade2Δ*-Zellen, die diesen Reporter besitzen auf Medium ohne Adenin, so können nur die überleben, deren *ASH1* mRNA Lokalisation intakt ist. Wird *ADE2* sowohl in der Mutter als auch in der Tochter nicht exprimiert, können die Zellen kein Adenin synthetisieren und sind auf eine Adeninzufuhr aus dem Medium angewiesen. Auf Adeninmangelplatten zeigen solche Zellen Wachstumsdefekte. Man tropft jeweils 5µl einer um Faktor 10 verdünnten Hefekultur auf die entsprechende Selektivplatte. Nach einer Inkubation von 3-4 Tagen bei 30°C kann das Koloniewachstum verglichen werden.

Eine zweite Möglichkeit, die Expression des *HO-ADE2* Reporters zu überprüfen, besteht darin, die Zellen auf Medium mit nur gering konzentriertem Adeningehalt Kolonien bilden zu lassen. Unter diesen Bedingungen wird der Stoffwechsel der Adeninbiosynthese aktiviert, die Zellen sterben nicht aufgrund des Adeninmangels. Durch die Aktivierung der Adeninbiosynthese sammelt sich in den Zellen, die *HO-ADE2* nicht exprimieren, das Stoffwechselintermediat Phosphoribosylaminoimidazol an, was die Kolonien rot erscheinen läßt.

5.5 Epitop-Markierung

Die Markierung von Proteinen mit verschiedenen Epitopen erfolgt nach der von Knop et al. beschriebenen Ein-Schritt-Markierung („one-step-tagging“). Über PCR wird ein Epitop-Modul amplifiziert, welches das entsprechende Epitop und ein Markergen enthält. Dabei wird mit dem Primer in Sinnrichtung eine ca. 50 Basen lange Sequenz, die zur 5`-Region vor dem Stopkodon des Zielgens homolog ist, an das 5`-Ende des Epitop-Moduls fusioniert. Mit dem Primer in Gegensinnrichtung wird eine ca. 50 Basen lange Sequenz, die zur 3`-Region direkt nach dem Stopkodon des Zielgens homolog ist, an das 3`-Ende des Epitop-Moduls fusioniert. Das aufgereinigte Amplifikationsprodukt wird mit der Hoch-Effizienz-Methode transformiert und integriert durch homologe Rekombination in das 3`-Ende des Zielgens, indem es das ursprüngliche Stopkodon durch das Epitop-Modul ersetzt. Auf Selektionsplatten werden die positiven Transformanten selektiert. Mit Proteinextrakten dieser Zellen wird ein Westernblot durchgeführt, um die Expression der Epitop-markierten Proteine mit Hilfe von Antikörpern zu verifizieren.

Eine zweite Möglichkeit der Epitopmarkierung ist die Transformation zuvor linearisierter integrativer Hefepiasmide. Hierzu wird das gewünschte Epitop entweder C- oder N-terminal an das Zielgen auf einem mit einem Markergen ausgestatteten integrativen Plasmid kloniert. Auch in diesem Fall wird das markierte Gen das Wildtyp-Gen durch homologe Rekombination ersetzt. Diese Epitopmarkierungsstrategie erlaubt zusätzlich die Möglichkeit den endogenen Promotor durch einen induzierbaren Promotor auszutauschen.

5.6 Herstellung von Proteinextrakten aus Hefezellen

Es werden 20 OD₆₀₀ Einheiten einer logarithmisch wachsenden Hefekultur benötigt. Die Zellen werden 5min bei 1000g abzentrifugiert. Das Zellsediment wird in seinem zweifachen Volumen Aufbrechpuffer resuspendiert. Dazu wird das gleiche Volumen Glaskügelchen gegeben. Der Zellaufbruch erfolgt auf dem IKA vibrax bei 4°C für 2x 3-5min mit einer zweiminütigen Pause auf Eis. 10µl des Aufbruchs werden benutzt zur BIORAD Proteinkonzentrationsbestimmung. Zum Rest wird 3x SDS Ladepuffer pipettiert (½ Volumen des Aufbrechpuffers) und für 5min auf 95°C denaturiert. Die Zelltrümmer und Glaskügelchen werden kurz abzentrifugiert. Der Überstand enthält lösliche Proteine. 50µg Gesamtprotein werden anschließend zur Analyse auf ein SDS-Protein-Gel geladen. Zur Lagerung können die Ansätze bei -20°C aufbewahrt werden.

Aufbrechpuffer: 50mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 50mM DTT; 1x Proteaseinhibitoren-Mix (CompleteTM, EDTA-frei)

5.7 Western Blot

Die Proteine werden über ein SDS-Acrylamid-Gel nach Standardprotokoll aufgetrennt. Der Proteintransfer erfolgt nach dem Semi-dry-Verfahren zwischen zwei horizontalen Plattenelektroden auf PVDF-Membran. Diese Membran auf Teflonbasis ist sehr hydrophob und besitzt dadurch eine hohe Bindekapazität. Vor dem Blotten wird die Membran 5sec mit Methanol angefeuchtet, 5min in H₂O gelegt und 10min in 1x Semi-dry-Puffer equilibriert. Membran und Gel (15min in 1x Semi-dry-Puffer equilibriert) werden zwischen 4 in Semi-dry-Puffer getränkte Whatman-Papiere gelegt. Die Proteine werden bei einem konstanten Strom von 0,8-2mA pro cm² Membran für 2-4h in Richtung Anode transferiert.

Nach Abschluss des Proteintransfers wird die Membran mit 1x PBS/0,1% Tween gewaschen und mit PonceauS conc. gefärbt. PonceauS ermöglicht eine reversible Färbung von Proteinen, die durch Waschen mit VE-Wasser und 1x PBS wieder entfernt werden kann. Unspezifische Bindungsstellen werden mit 1x PBS/0,1% Tween/5% Milchpulver abgesättigt (3x mind. 10min). Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgt ÜN. Nach drei 15minütigen Waschschritten mit 1xPBS/0,1% Tween erfolgt die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper. Es folgen zwei weitere Waschschrritte mit 1xPBS/0,1% Tween und ein finaler Waschschrtritt mit 1x PBS. Dann werden die Proteine über ein Chemilumineszenz-System (ECL oder ECF) nach Vorschrift des Herstellers detektiert. Das ECL-System arbeitet mit einer an den zweiten Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase, die die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Hierbei wird Licht frei, welches auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Das ECF-System produziert eine starke Fluoreszenz (540-560nm) durch die Abspaltung einer Phosphatgruppe vom Substrat in Anwesenheit der an den Sekundär-Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase.

10x PBS: 73g NaCl; 24g Na₂HPO₄; 14g NaH₂PO₄; ad 1000ml bidest. H₂O, pH 7,0-7,2

5.8 DNA-Präparation aus Hefe

Sofern die DNA-Präparation nicht mit dem DNeasy Kit von Qiagen durchgeführt wurde, wurde die schnelle genomische DNA Präparation angewandt. Hierzu werden 5ml einer stationären Hefe-Übernachtskultur benötigt. Diese werden in 15ml Reaktionsröhrchen 5min

bei 1000g zentrifugiert. Die Zellen werden mit 1ml H₂O gewaschen, in 1,5ml Reaktionsgefäße transferiert und erneut zentrifugiert (15sec, 10.000g). Danach werden die Zellen in 200µl Puffer S resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Glaskügelchen und 200µl Phenol werden die Zellen auf dem IKA Vibrax 3min bei 4°C aufgebrochen. Anschließend wird der Ansatz 5min bei 10.000g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres mal mit 200µl Phenol ausgeschüttelt. Der Überstand nach der 5minütigen Zentrifugation wird in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Die genomische DNA wird mit 400µl Ethanol bei 4°C gefällt und 5min bei 10.000g zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen, das Pellet in 200µl TE gelöst und mit 1µl RNase A (10mg/ml) 45min bei 37°C inkubiert. Dieser Ansatz wird mit 20µl 3M Na-acetat (pH 5,2) gemischt und die DNA mit 500µl bei 4°C präzipitiert. Die sedimentierte DNA (10min, 10.000g) wird mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30µl TE resuspendiert.

Puffer S: 1% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA
TE: 10mM Tris-HCl, 0,2mM EDTA; pH 8,0

5.9 RNA-Präparation aus Hefe (Cross and Tinkelenberg 1991)

15ml einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wird bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 in 50ml Reaktionsröhrchen 5min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 1ml eiskaltem TE in 2ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen werden 10sec bei 10000g in der Tischzentrifuge bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Hier können die Zellen für einige Zeit bei -20°C gelagert werden.

Zu dem Pellet werden 200µl Glaskügelchen, 400µl eines Phenolgemisches (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 50:49:1) und 500µl Cross-RNA Puffer1 pipettiert. Es wird 10 min bei 4°C gevortext. Anschließend wird der Überstand in 1ml vorgekühlten -20°C kalten Ethanol pipettiert. Nach Mischen wird die RNA bei -20°C mindestens 10 Minuten präzipitiert. Anschließend wird 5 Minuten bei 10000g zentrifugiert und das Sediment wird in 200µl Cross-RNA-Puffer2 oder sterilem, RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zum leichteren Lösen der RNA wird diese für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach vollständigem Lösen der RNA wird deren Konzentration bei 260nm gemessen.

Um ausreichend RNA für eine folgende mRNA-Anreicherung zu erhalten kann mit den jeweiligen 10fachen Volumina gearbeitet werden. Die Elution der RNA sollte jedoch in 400µl sterilem, RNase-freiem Wasser erfolgen.

Cross RNA Puffer1: 0,3M NaCl, 10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 0.2% SDS

Cross RNA Puffer 2: 1x TE + 0.2% SDS

Phenolgemisch: Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 50:49:1, equilibriert in TE.

5.10 mRNA-Aufreinigung

Für 1mg Total RNA werden 40mg oligo-dT Zellulose im Elutionspuffer aufgequellert, anschließend noch 4x mit demselbigen gewaschen. Mittels 2-3 Waschschritten mit 1x Bindepuffer, wird die oligo-dT Zellulose equilibriert.

1mg Total RNA/600µl H₂O werden 4min bei 65°C inkubiert. Danach mit jeweils 600µl 2x Bindepuffer gewaschen und zur equilibrierten oligo-dT Zellulose zugefügt. Es folgt eine 15minütige Inkubation auf dem Drehrad bei RT. Die oligo-dT Zellulose, an die jetzt die mRNA gebunden hat wird abzentrifugiert und 2x mit 1x Bindepuffer und anschließend 2x mit Waschpuffer gewaschen. Die mRNA wird mit 250µl Elutionspuffer bei 37°C für 5min eluiert. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt wird der Überstand aufbewahrt und die pelletierte oligo-dT Zellulose erneut mit 250µl Elutionspuffer behandelt und zentrifugiert. Die beiden Überstände werden jetzt zusammengeführt und mit H₂O zu einem Volumen von 600µl aufgefüllt. Die Prozedur wird nochmals wiederholt, beginnend mit der 4-minütigen Inkubation bei 65°C.

Zum Eluat gibt man 50µl 4M NaCl und präzipitiert die mRNA mit dem 2fachen Volumen eiskaltem Ethanol für 1h bei -20°C. Das Präzipitat wird mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20µl H₂O gelöst.

Die Konzentration wird bei 260nm gemessen. Üblicherweise erhält man aus 2mg Total RNA 10-20µg mRNA.

2x Bindepuffer: 1M NaCl; 20mM Tris pH 7,5; 2mM EDTA; 0,1% SDS

1x Bindepuffer: 0,5M NaCl; 10mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 0,05% SDS

Waschpuffer: 0,2M NaCl; 10mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 0,05% SDS

Elutionspuffer: 10mM Tris pH 7,5; 1mM EDTA; 0,05% SDS

5.11 Herstellung einer ³²P-markierten Sonde

Zur Herstellung einer ³²P-markierten Sonde wird der „Prime-It II Random Primer Labeling Kit“ von Stratagene verwendet. Die jeweilige Sonden-DNA wird aus genomischer Hefe-DNA nach Standard-PCR-Protokoll amplifiziert und mit dem Qiagen-PCR-Purification Kit

gereinigt. 25ng dieser DNA wird pro radioaktiven Markierungs-Ansatz eingesetzt. Die Markierungsreaktion erfolgt nach Angaben des Herstellers. Anschließend wird die radioaktive Sonde über BIORAD-Säulchen gereinigt.

5.12 Northern Blot

20µg-40µg Total RNA gelöst in 15µl H₂O werden zusammen mit 5µl 10x MOPS, 9µl 37% Formaldehyd, 21µl Formamid und 10µl Ladepuffer für 15min auf 65°C inkubiert. 20µl dieses Ansatzes werden dann auf ein 1,5% Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNAs erfolgt bei einer konstanten Spannung von 6V/cm. Vor dem Transfer der RNA auf die positiv geladene Hybond N+ Nylon Membran, wird das Gel mehrmals mit H₂O gewaschen und in 10x SSC equilibriert. Der Transfer erfolgt ÜN über Kapillarkräfte, mit 10x SSC als Transferpuffer. Nach dem Transfer wird die Membran kurz mit 2x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Die RNA wird über UV (Stratalinker) auf die Membran fixiert. Zur Lade- und RNA-Degradationskontrolle wird die Membran mit 0,04% Methylenblau in 0,5M NaAc pH5,5 reversible gefärbt.

Die Prähybridisierung wurde standardmäßig in einem Volumen von 25ml durchgeführt. Zunächst werden 11,5ml H₂O mit 115µl Heringssperma-DNA (10mg/ml) für 7min aufgeköcht, auf Eis gestellt und 13,5ml Scp/Sarc/DS Mix dazu pipettiert. Der Prähybridisierungs-Mix wird auf die Membran in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Inkubationsdauer bei 65°C beträgt 1-2h. Für die Hybridisierung wird die ³²P-markierte Sonde (mind. 1x 10⁶cpm/ml) vorsichtig direkt in die Prähybridisierungslösung pipettiert. Das Röhrchen wird kurz gevortext und ÜN bei 65°C hybridisiert. Die Membran wird 2x kurz mit 2x SSC/0,1% SDS bei RT gespült und 2x 20min in 0,5x SSC/0,1% SDS bei 43°C-55°C gewaschen. Es folgt die Auswertung der Signale mit dem Phosphorimager.

10x MOPS: 48.1g MOPS + 800ml H₂O; pH 7,0 mit NaOH einstellen. Dann 16,6ml 3M NaAc und 20ml 0,5M EDTA pH 8,0 dazugeben, ad 1l H₂O.

Ladepuffer: 1mM EDTA pH 8,0; 0,25%Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol, 50% Glycerin

20xSSC: 3M NaCl; 0,3M Na₃-citrat

20x Scp: 2M NaCl; 0,6M Na₂HPO₄; 0,02M EDTA; pH 6,2

Scp/Sarc/Ds-Mix: 20g Dextransulfat in 60ml 20x Scp ad 101ml H₂O unter Hitzeeinwirkung lösen. Dann 7ml 30% N-Lauroylsarcosine (SLS) dazugeben.

5.13 Microarray-Analyse

Die GeneFilters Microarrays von Research Genetics sind Hybridisierungsfertige Nylonmembranen. 6144 kodierende Sequenzen sind als einzelne Punkte maschinell auf die Membranen aufgetragen. Als Orientierungshilfe und Hybridisierungskontrolle sind mehrere definierte Reihen mit genomischer DNA auf den Filtern zu finden.

Die radioaktive Markierung der RNA mit ^{33}P dCTP erfolgt exakt nach Anleitung von Research Genetics. Pro Hybridisierung wird 0,33 μg aufgereinigte mRNA eingesetzt. Die Hybridisierung wird nach mitgeliefertem Protokoll durchgeführt. Nach den einzelnen Waschschrritten folgt eine Autoradiographie. Die Analyse der Signale erfolgt nach 48h Expositionsdauer entweder direkt auf den Röntgenfilmen oder die Filme wurden eingescannt, mittels AdobePhotoshop mit Falschfarben (rot/grün) eingefärbt und ausgewertet. Auf der Homepage von Research Genetics (<http://www.resgen.com>) befindet sich eine Datenbank, mit der jeder einzelne DNA-Punkt auf den Nylonmembranen der entsprechenden kodierenden Sequenz zugeordnet werden kann.

5.14 Immunfluoreszenz

5.14.1 Vorbereitung der Zellen

5-10ml einer logarithmisch wachsenden Kultur wird unter Schütteln bei 30°C für 1 Stunde mit final 3,7% Formaldehyd fixiert. Danach werden die Zellen für 15 Sekunden bei 10.000g pelletiert und das Medium abgesaugt. Im folgenden Waschschrtritt wird das Zellpellet in 1ml Sphäroblastierungspuffer resuspendiert und erneut für 15sec bei 10.000g zentrifugiert. Der gesamte Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt, bis die Zellen schließlich in 500 μl Sphäroblastierungspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 50 μg Zymolase 100T und 1 μl 2-Mercaptoethanol für 30min bei 30°C sphäroblastiert werden. Nach der Sphäroblastierung werden die Zellen für 3min bei 1000g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird in 1ml Sphäroblastierungspuffer gewaschen und erneut 3min bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, während das Zellpellet in 30-200 μl Sphäroblastierungspuffer aufgenommen wird. Die Zellen können nun direkt in der Immunfluoreszenz verwendet werden, oder aber bis zu mehreren Monaten bei -80°C gelagert werden.

Sphäroblastierungspuffer: 1,2M Sorbitol; 0,1M Kaliumphosphat (pH 7,4); 0,5 mM MgCl_2 .

5.14.2 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz werden „Multi-Well“-Objektträger, d.h. Objektträger, die in mehrere - in diesem Fall 10-12 - Sichtfelder oder Wells (= „Lichtschächte“) unterteilt sind und somit die Beobachtung von 10-12 unabhängigen Proben auf einem Objektträger ermöglichen, verwendet. Die einzelnen Felder des Objektträgers werden zunächst mit Poly-L-Lysin behandelt, indem 10-20µl 0,02% Poly-L-Lysin auf ein Feld gegeben wurde. Das Poly-L-Lysin wird abgesaugt und die Felder 2x mit 100µl H₂O gewaschen und schließlich an der Luft getrocknet. Auf je ein Feld werden 10µl Zellsuspension pipettiert. Nach ca. 5 Minuten werden 30µl Blockierungslösung zugegeben, die nach 10min abgesaugt werden. Die auf dem Objektträger haftenden Zellen werden dann für 2h bei RT mit 10µl des in Blockierungslösung verdünnten Primärantikörpers inkubiert. Anschließend werden die Zellen 3x je 1min mit Waschlösung gewaschen bevor sie für 1h mit 10µl des in Blockierungslösung verdünnten Sekundärantikörpers inkubiert werden. Auf diese Inkubation folgt ein dreimaliges je einminütiges Waschen mit Waschlösung. Zuletzt werden die Zellen für 10min mit 0,1µl/ml DAPI in 1xPBS behandelt, bevor sie einmal mit 1xPBS gewaschen und mit Decklösung und einem Deckgläschen versiegelt werden.

Blockierungslösung: 1xPBS; 1% BSA.

Waschlösung: 1xPBS; 1% BSA; 0,1% Triton-X-100.

Decklösung: 1xPBS; 80% Glyzerin.

Primärantikörper/Verdünnung	Sekundärantikörper/Verdünnung	Epitop
Ratte-Anti-HA-Antikörper (3F10)/ 1:10	Alexa-Fluor488-Kaninchen-Anti-Ratte/1:100	HA
Maus-Anti-myc (9E10)/ 1:300	Alexa-Fluor488-Ziege-Anti-Maus/1:500	MYC

5.15 Aktinfärbung

Das aus dem Pilz *Amanita phalloides* isolierte Toxin Phalloidin bindet spezifisch an F-Aktin. Für die folgende Aktinfärbung wird mit Alexa Fluor 488 gekoppeltes Phalloidin verwendet. Es ermöglicht morphologische Untersuchungen des Aktinzytoskeletts. Die Zellen werden wie in Abschnitt 5.14.1 sphäroblastiert und auf mit 0,02% Poly-L-Lysin behandelte Multiwell-Objektträger aufgetragen. Nach 5min wird der Überschuss abgesaugt und die haftenden Zellen

werden 1x 5min und 1x 30min mit 1xPBS/1%BSA/0,05%NaAzid gewaschen. Danach wird pro Vertiefung 5µl 1:10 verdünntes (in 1xPBS/1%BSA/0,05%NaAzid/0,1%Triton X-100) Alexa Fluor 488 gekoppeltes Phalloidin hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 40min in einer dunklen Feuchtekammer werden die Zellen 3x mit 1xPBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 0,1µg/ml DAPI in 1xPBS 5min inkubiert. Nach einem letzten Waschen mit 1x PBS wird der Objektträger mit Decklösung versiegelt.

5.16 Calcofluor-Färbung

Chitinreiche Strukturen, wie die Knosbungsarben der Bäckerhefe kann man mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Calcofluor Weiß M2R anfärben. Hierzu benötigt man 1ml logarithmisch wachsende Zellen. Diese werden einmal mit H₂O gewaschen und in 200µl Calcofluor-Lösung (1mg/ml Calcofluor in H₂O) resuspendiert. In einem 1,5ml Reagenzröhrchen werden die Zellen abgedunkelt 10min bei RT inkubiert. Die Zellen werden 3x mit H₂O gewaschen und auf Multiwell-Objektträger aufgetragen. Nach der Versiegelung mit Decklösung können die gefärbten Zellen direkt analysiert werden.

5.17 *In-situ* Hybridisierung

Für die *in situ* Hybridisierung wurde im wesentlichen die von Takizawa et al. und Münchow et al. (Takizawa, Sil et al. 1997; Munchow, Sauter et al. 1999) beschriebenen Protokolle angewandt. Die Gegensinnrichtung-Primer für die Generierung der anti-sense Sonden sind jeweils mit einem T7 Promotor ausgestattet. Für die *in vitro* Transkription der Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden wurde exakt nach Protokoll des T7-Megashortscript Kit von Ambion gearbeitet. Des Weiteren wurde das Protokoll für Multi-Well-Objektträger adaptiert, um die Handhabung zu erleichtern und den Einsatz an Reagenzien zu minimieren.

5.18 Das Luziferase-Reportersystem

Das Enzym Luziferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* katalysiert in Anwesenheit von Mg²⁺ Ionen und unter ATP-Hydrolyse die oxidative Decarboxylierung von Luziferin zu Oxylluziferin. Als Folge der Reaktion werden Photonen freigesetzt, die sich in einem Bioluminometer quantifizieren lassen.

Das *Luziferase* Gen wurde aus dem Plasmid pUHC131-1 (Gossen and Bujard 1992) mit den Restriktionsenzymen NcoI und XbaI herausgeschnitten und mit dem PCR-amplifizierten *PCL5* Promotor in YCplac-Plasmide kloniert. Die Hefe-Plasmide, die jetzt das Luziferase-Reportersystem unter der Kontrolle des *PCL5* Promotors haben wurden dann in Hefezellen transformiert.

Für das Analysieren der Genexpression mit dem Luciferase Assay System von Promega werden 10 OD-Einheiten Hefezellen benötigt. Die Zellen werden 1x mit H₂O gewaschen und in 120µl 1x Luziferase-Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von ca. 50-100µl Glaskügelchen werden die Zellen auf dem IKA Vibrax (10x 30sec mit jeweils 30sec Pausen auf Eis) aufgebrochen. Anschließend werden Zelltrümmer und Glaskügelchen abzentrifugiert (30sec, 10000g). 10µl des Überstands werden mit 250µl Luziferase-Meßpuffer verdünnt und im Bioluminometer automatisch mit 100µl Luciferase Assay Reagenz (Promega) versetzt. Das emittierte Licht wird von einem Photomultiplier 10sec gemessen, integriert und als relative Lichteinheiten (RLU) angegeben.

5x Luziferase-Lyse Puffer: 125mM Tris pH7,8 ; 10mM EDTA ; 10mM DTT ; 50% Glycerin ; 5% Triton

Luziferase-Meßpuffer: 15mM MgSO₄; 25mM Glycylglycin; pH7,5; 5mM ATP

5.19 Transformation von DNA in Bakterien

5.19.1 Kompetente Zellen

Eine Kolonie des *E.coli* Stammes TOP10 wird ÜN in 3ml LB-Medium bei 37°C herangezogen. Am nächsten Tag werden 0,5ml dieser Kultur entnommen, in 20ml LB-Medium überführt und erneut ÜN bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag werden mit der Übernachtskultur 50ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca.0,7-0,8 bei 37°C inkubiert. Die Kultur wird dann 15min auf Eis gestellt und anschließend bei 5000g, 4°C 15min abzentrifugiert. Das Zellsediment wird mit der Hälfte des ursprünglichen Kulturvolumens an kalter resuspendiert und 30min auf Eis inkubiert. Dann werden die Zellen bei 5000g, 4°C 15min pelletiert und in 1/20 des Kulturvolumens kaltes 0,1M CaCl₂/10%Glycerin aufgenommen. Die kompetenten TOP10-Zellen können dann aliquotiert werden und bei -80°C lagern.

5.19.2 Transformation

Die CaCl_2 -kompetenten Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut. 1-10ng der zu transformierenden DNA oder 5-10 μl des Ligationsansatzes werden in 1,5ml Reaktionsgefäßen auf Eis gekühlt. Dann werden 50 μl der kompetenten Zellen dazu pipettiert und mindestens 5min auf Eis inkubiert. Der Transformationansatz kann sofort auf Selektionsplatten ausplattiert werden. Nach einer ÜN Inkubation bei 37°C sind dann die positiv transformierten Kolonien zu sehen.

Diese 5min-Hoch-Effizienz Methode ist auch anwendbar für Plasmide, die nach Protokoll des New England Biolabs Quick Ligation Kit ligiert wurden.

5.20 Präparation von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke und Sequenzierungen wurde die Plasmid-DNA mittels des QIAprep Spin Miniprep Kit nach Anleitung des Herstellers (Qiagen) gewonnen.

Zur präparativen Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Nucleobond-AX-100 Midiprep Kit von Machery&Nagel verwendet.

6 Literaturverzeichnis

- Albrecht, G., H. U. Mosch, et al. (1998). "Monitoring the Gcn4 protein-mediated response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **273**(21): 12696-702.
- Barral, J. M., C. C. Bauer, et al. (1998). "Unc-45 mutations in *Caenorhabditis elegans* implicate a CRO1/She4p-like domain in myosin assembly." J Cell Biol **143**(5): 1215-25.
- Barral, J. M., A. H. Hutagalung, et al. (2002). "Role of the myosin assembly protein UNC-45 as a molecular chaperone for myosin." Science **295**(5555): 669-71.
- Bashirullah, A., R. L. Cooperstock, et al. (1998). "RNA localization in development." Annu Rev Biochem **67**: 335-94.
- Beach, D. L. and K. Bloom (2001). "ASH1 mRNA localization in three acts." Mol Biol Cell **12**(9): 2567-77.
- Beach, D. L., E. D. Salmon, et al. (1999). "Localization and anchoring of mRNA in budding yeast." Curr Biol **9**(11): 569-78.
- Bertrand, E., P. Chartrand, et al. (1998). "Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast." Mol Cell **2**(4): 437-45.
- Bhoite, L. T., J. M. Allen, et al. (2002). "Mutations in the pho2 (bas2) transcription factor that differentially affect activation with its partner proteins bas1, pho4, and swi5." J Biol Chem **277**(40): 37612-8.
- Bhoite, L. T., Y. Yu, et al. (2001). "The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II." Genes Dev **15**(18): 2457-69.
- Blacketer, M. J., P. Madaule, et al. (1995). "Mutational analysis of morphologic differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **140**(4): 1259-75.
- Bobola, N., R. P. Jansen, et al. (1996). "Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells." Cell **84**(5): 699-709.
- Bohl, F., C. Kruse, et al. (2000). "She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p." Embo J **19**(20): 5514-24.
- Carroll, A. S. and E. K. O'Shea (2002). "Pho85 and signaling environmental conditions." Trends Biochem Sci **27**(2): 87-93.
- Chandarlapaty, S. and B. Errede (1998). "Ash1, a daughter cell-specific protein, is required for pseudohyphal growth of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **18**(5): 2884-91.

- Chang, F. and D. G. Drubin (1996). "Cell division: why daughters cannot be like their mothers." Curr Biol **6**(6): 651-4.
- Chartrand, P., X. H. Meng, et al. (1999). "Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo." Curr Biol **9**(6): 333-6.
- Chartrand, P., R. H. Singer, et al. (2001). "RNP localization and transport in yeast." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 297-310.
- Cormack, B. P., G. Bertram, et al. (1997). "Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*." Microbiology **143** (Pt 2): 303-11.
- Cosma, M. P. (2002). "Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation." Mol Cell **10**(2): 227-36.
- Cosma, M. P., S. Panizza, et al. (2001). "Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF." Mol Cell **7**(6): 1213-20.
- Cosma, M. P., T. Tanaka, et al. (1999). "Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter." Cell **97**(3): 299-311.
- Cross, F. R. and A. H. Tinkelenberg (1991). "A potential positive feedback loop controlling CLN1 and CLN2 gene expression at the start of the yeast cell cycle." Cell **65**(5): 875-83.
- Dong, Y., D. Pruyne, et al. (2003). "Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast." J Cell Biol **161**(6): 1081-92.
- Doolin, M. T., A. L. Johnson, et al. (2001). "Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p." Mol Microbiol **40**(2): 422-32.
- Ernst, J. F. (2000). "Regulation of dimorphism in *Candida albicans*." Contrib Microbiol **5**: 98-111.
- Ernst, J. F. (2000). "Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis." Microbiology **146** (Pt 8): 1763-74.
- Evangelista, M., K. Blundell, et al. (1997). "Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis." Science **276**(5309): 118-22.
- Fazio, T. G., C. Kooperberg, et al. (2001). "Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression." Mol Cell Biol **21**(19): 6450-60.
- Galitski, T., A. J. Saldanha, et al. (1999). "Ploidy regulation of gene expression." Science **285**(5425): 251-4.

- Gancedo, J. M. (2001). "Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*." FEMS Microbiol Rev **25**(1): 107-23.
- Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, et al. (1992). "Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS." Cell **68**(6): 1077-90.
- Gonzalez, I., S. B. Buonomo, et al. (1999). "ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation." Curr Biol **9**(6): 337-40.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Goutte, C. and A. D. Johnson (1988). "a1 protein alters the DNA binding specificity of alpha 2 repressor." Cell **52**(6): 875-82.
- Govindan, B., R. Bowser, et al. (1995). "The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport." J Cell Biol **128**(6): 1055-68.
- Haarer, B. K., A. Petzold, et al. (1994). "Identification of MYO4, a second class V myosin gene in yeast." J Cell Sci **107** (Pt 4): 1055-64.
- Haber, J. E. (1998). "Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*." Annu Rev Genet **32**: 561-99.
- Hirst, K., F. Fisher, et al. (1994). "The transcription factor, the Cdk, its cyclin and their regulator: directing the transcriptional response to a nutritional signal." Embo J **13**(22): 5410-20.
- Hull, C. M. and A. D. Johnson (1999). "Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*." Science **285**(5431): 1271-5.
- Hull, C. M., R. M. Raisner, et al. (2000). "Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host." Science **289**(5477): 307-10.
- Hurt, E., K. Strasser, et al. (2000). "Mex67p mediates nuclear export of a variety of RNA polymerase II transcripts." J Biol Chem **275**(12): 8361-8.
- Irie, K., T. Tadauchi, et al. (2002). "The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast." Embo J **21**(5): 1158-67.
- Jansen, R. P. (2001). "mRNA localization: message on the move." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 247-56.
- Jansen, R. P., C. Dowzer, et al. (1996). "Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins." Cell **84**(5): 687-97.

- Johnston, G. C., J. A. Prendergast, et al. (1991). "The *Saccharomyces cerevisiae* MYO2 gene encodes an essential myosin for vectorial transport of vesicles." J Cell Biol **113**(3): 539-51.
- Kaffman, A., I. Herskowitz, et al. (1994). "Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85." Science **263**(5150): 1153-6.
- Krebs, J. E., M. H. Kuo, et al. (1999). "Cell cycle-regulated histone acetylation required for expression of the yeast HO gene." Genes Dev **13**(11): 1412-21.
- Kron, S. J., C. A. Styles, et al. (1994). "Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **5**(9): 1003-22.
- Kruse, C., A. Jaedicke, et al. (2002). "Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p." J Cell Biol **159**(6): 971-82.
- Kwon, S. and B. J. Schnapp (2001). "RNA localization: SHedding light on the RNA-motor linkage." Curr Biol **11**(5): R166-8.
- Li, T., Y. Jin, et al. (1998). "Crystal structure of the MATa1/MATalpha2 homeodomain heterodimer in complex with DNA containing an A-tract." Nucleic Acids Res **26**(24): 5707-18.
- Li, T., M. R. Stark, et al. (1995). "Crystal structure of the MATa1/MAT alpha 2 homeodomain heterodimer bound to DNA." Science **270**(5234): 262-9.
- Lipshitz, H. D. and C. A. Smibert (2000). "Mechanisms of RNA localization and translational regulation." Curr Opin Genet Dev **10**(5): 476-88.
- Lo, H. J., J. R. Kohler, et al. (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." Cell **90**(5): 939-49.
- Loeb, J. D., T. A. Kerentseva, et al. (1999). "*Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins are differentially involved in invasive and pseudohyphal growth independent of the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway." Genetics **153**(4): 1535-46.
- Long, R. M., W. Gu, et al. (2000). "She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA." Embo J **19**(23): 6592-601.
- Long, R. M., W. Gu, et al. (2001). "An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast." J Cell Biol **153**(2): 307-18.
- Long, R. M., R. H. Singer, et al. (1997). "Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA." Science **277**(5324): 383-7.
- Madhani, H. D. (2000). "Interplay of intrinsic and extrinsic signals in yeast differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(25): 13461-3.

- Madhani, H. D. and G. R. Fink (1998). "The control of filamentous differentiation and virulence in fungi." Trends Cell Biol **8**(9): 348-53.
- Magee, B. B. and P. T. Magee (2000). "Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains." Science **289**(5477): 310-3.
- Maxon, M. E. and I. Herskowitz (2001). "Ash1p is a site-specific DNA-binding protein that actively represses transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1495-500.
- McBride, H. J., A. Sil, et al. (2001). "The protein kinase Pho85 is required for asymmetric accumulation of the Ash1 protein in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Microbiol **42**(2): 345-53.
- Measday, V., H. McBride, et al. (2000). "Interactions between Pho85 cyclin-dependent kinase complexes and the Swi5 transcription factor in budding yeast." Mol Microbiol **35**(4): 825-34.
- Measday, V., L. Moore, et al. (1997). "A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase." Mol Cell Biol **17**(3): 1212-23.
- Meimoun, A., T. Holtzman, et al. (2000). "Degradation of the transcription factor Gcn4 requires the kinase Pho85 and the SCF(CDC4) ubiquitin-ligase complex." Mol Biol Cell **11**(3): 915-27.
- Moll, T., G. Tebb, et al. (1991). "The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5." Cell **66**(4): 743-58.
- Mosch, H. U. and G. R. Fink (1997). "Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **145**(3): 671-84.
- Munchow, S., D. Ferring, et al. (2002). "Characterization of *Candida albicans* ASH1 in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **41**(2): 73-81.
- Munchow, S., C. Sauter, et al. (1999). "Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins." J Cell Sci **112** (Pt 10): 1511-8.
- Nantel, A., D. Dignard, et al. (2002). "Transcription profiling of *Candida albicans* cells undergoing the yeast-to-hyphal transition." Mol Biol Cell **13**(10): 3452-65.
- Nasmyth, K. (1993). "Regulating the HO endonuclease in yeast." Curr Opin Genet Dev **3**(2): 286-94.
- Nasmyth, K., A. Seddon, et al. (1987). "Cell cycle regulation of SWI5 is required for mother-cell-specific HO transcription in yeast." Cell **49**(4): 549-58.
- Natarajan, K., M. R. Meyer, et al. (2001). "Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast." Mol Cell Biol **21**(13): 4347-68.

- Navarro-Garcia, F., M. Sanchez, et al. (2001). "Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*." FEMS Microbiol Rev **25**(2): 245-68.
- Palecek, S. P., A. S. Parikh, et al. (2002). "Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth." Microbiology **148**(Pt 4): 893-907.
- Pan, X., T. Harashima, et al. (2000). "Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Opin Microbiol **3**(6): 567-72.
- Pan, X. and J. Heitman (2000). "Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion." Mol Cell Biol **20**(22): 8364-72.
- Pries, R., K. Bomeke, et al. (2002). "Amino acid-dependent Gcn4p stability regulation occurs exclusively in the yeast nucleus." Eukaryot Cell **1**(5): 663-72.
- Pruyne, D. and A. Bretscher (2000). "Polarization of cell growth in yeast." J Cell Sci **113** (Pt 4): 571-85.
- Reck-Peterson, S. L., D. W. Provance, Jr., et al. (2000). "Class V myosins." Biochim Biophys Acta **1496**(1): 36-51.
- Reck-Peterson, S. L., M. J. Tyska, et al. (2001). "The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors." J Cell Biol **153**(5): 1121-6.
- Rongo, C., E. R. Gavis, et al. (1995). "Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein." Development **121**(9): 2737-46.
- Sanchez-Martinez, C. and J. Perez-Martin (2001). "Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*--similar inputs, different outputs." Curr Opin Microbiol **4**(2): 214-21.
- Saunders, C. and R. S. Cohen (1999). "The role of oocyte transcription, the 5'UTR, and translation repression and derepression in *Drosophila* gurken mRNA and protein localization." Mol Cell **3**(1): 43-54.
- Schneider, K. R., R. L. Smith, et al. (1994). "Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81." Science **266**(5182): 122-6.
- Shemer, R., A. Meimoun, et al. (2002). "Regulation of the transcription factor Gcn4 by Pho85 cyclin PCL5." Mol Cell Biol **22**(15): 5395-404.
- Shepherd, M. G., R. T. Poulter, et al. (1985). "*Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity." Annu Rev Microbiol **39**: 579-614.
- Shore, P. and A. D. Sharrocks (1995). "The MADS-box family of transcription factors." Eur J Biochem **229**(1): 1-13.

- Sil, A. and I. Herskowitz (1996). "Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene." Cell **84**(5): 711-22.
- Stanhill, A., N. Schick, et al. (1999). "The yeast ras/cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress response." Mol Cell Biol **19**(11): 7529-38.
- Takizawa, P. A., J. L. DeRisi, et al. (2000). "Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier." Science **290**(5490): 341-4.
- Takizawa, P. A., A. Sil, et al. (1997). "Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast." Nature **389**(6646): 90-3.
- Takizawa, P. A. and R. D. Vale (2000). "The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5273-8.
- Tanaka, K. and Y. Takai (1998). "Control of reorganization of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast." Curr Opin Cell Biol **10**(1): 112-6.
- Thio, G. L., R. P. Ray, et al. (2000). "Localization of gurken RNA in Drosophila oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript." Dev Biol **221**(2): 435-46.
- Titus, M. A. (1997). "Motor proteins: myosin V--the multi-purpose transport motor." Curr Biol **7**(5): R301-4.
- Toi, H., K. Fujimura-Kamada, et al. (2003). "She4p/Dim1p Interacts with the Motor Domain of Unconventional Myosins in the Budding Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Biol Cell **14**(6): 2237-49.
- Tzung, K. W., R. M. Williams, et al. (2001). "Genomic evidence for a complete sexual cycle in *Candida albicans*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3249-53.
- van Burik, J. A. and P. T. Magee (2001). "Aspects of fungal pathogenesis in humans." Annu Rev Microbiol **55**: 743-72.
- Visintin, R. and A. Amon (2000). "The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks." Curr Opin Cell Biol **12**(3): 372-7.
- Wesche, S., M. Arnold, et al. (2003). "The UCS Domain Protein She4p Binds to Myosin Motor Domains and Is Essential for Class I and Class V Myosin Function." Curr Biol **13**(9): 715-24.
- Whiteway, M. (2000). "Transcriptional control of cell type and morphogenesis in *Candida albicans*." Curr Opin Microbiol **3**(6): 582-8.
- Wilson, W. A. and P. J. Roach (2002). "Nutrient-regulated protein kinases in budding yeast." Cell **111**(2): 155-8.
- Wolberger, C. (1998). "Combinatorial transcription factors." Curr Opin Genet Dev **8**(5): 552-9.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEBSF	(4-(2-Aminoethyl)-p-benzenesulfonylfluoride)
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Cirka
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CIP	Alkalische Phosphatase
C-terminal	Carboxyterminal
DAPI	4, 6-Diamino-2-Phenylindol
DIC	Digital Interference Contrast
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxyribonucleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Schwerefeldbeschleunigung der Erde
gr	Gramm
GST	Gluthathion-S-Transferase

h	Stunde
HA	Hämagglutinin
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luri-Bertrani-Medium
LDS	Lithium-Dodecylsulfat
M	Molar
mA	Milliampere
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgOAc	Magnesiumacetat
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-terminal	Aminoterminal
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x Nanometer
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
³² P	Phosphor-Isotop
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia hydrogenii

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
RNP	Ribonucleoprotein
rNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
rpm	“Revolutions per minute”
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SLAD	Synthetic minimalmedia low ammonia Dextrose
SSC	Standard Saline Citrat
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	“unit”, internationale Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
URS	“Upstream Regulatory Sequence”
UTR	nicht translatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
YEP	“Yeast Extract Peptone”
YEPD	“Yeast Extract Peptone Dextrose”
YNB	“Yeast Nitrogen Base”
WT	Wildtyp

8 Publikationen

Publikationen in Zeitschriften

Münchow S, Sauter C, Jansen RP.

Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins.

J Cell Sci. 1999 May;112 (Pt 10):1511-8.

Münchow S, Ferring D, Kahlina K, Jansen RP.

Characterization of *Candida albicans* *ASH1* in *Saccharomyces cerevisiae*.

Curr Genet. 2002 May;41(2):73-81. Epub 2002 Apr 27.

Präsentationen

C. Kruse, C. Sauter, **S. Münchow**, A. Frank, R.-P. Jansen; 1999. The unconventional myosin Myo4p and its role in cytoplasmic mRNA transport. XIX International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology.

S.Münchow, D.Ferring, K.Kahlina, R.-P.Jansen. Functional Analysis of a *Candida albicans* Homologue of *ASH1* in *S.cerevisiae*. VAAM-Tagung 2001, Molekularbiologie der Pilze, Jena, Deutschland und ELSO Meeting 2002, Nizza, Frankreich.

Ausgewählt als Vortrag

S.Münchow, R.-P.Jansen; 2000. Differentially expressed target genes of the daughter-cell-specific transcription factor *ASH1*. Euresco, Gene Transcription in Yeast (2000-103), Albufeira, Portugal.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf Peter Jansen für die Überlassung des Arbeitsplatzes und des interessanten Themas, sowie seiner außergewöhnlich guten Betreuung bedanken.

Bei Dr. Blanche Schwappach möchte ich mich bedanken für die Begutachtung meiner Arbeit. Mein Dank geht in gleichem Maße an meinen Freund Markus, meine Familie und an meine Freunde. Jeder hat auf seine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dunja Ferring, Dominik Djandji und Frieder Merz für die Durchsicht des Manuskripts und den angebrachten und guten Verbesserungsvorschlägen. Dunja Ferring gilt noch ein zusätzlicher Dank für die perfekte Zusammenarbeit, die letztendlich zu einer gemeinsamen Publikation geführt hat.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Labors bedanken: Dunja Ferring, Claudia Kruse und Birgit Maertens, die dazu beigetragen haben jeden Tag mit Freude ins Labor zu kommen und immer bereit waren für wissenschaftliche Diskussionen und Unterstützung in jeder Hinsicht. Bei Andreas Jaedicke möchte ich mich nicht nur für die musikalische Unterstützung bedanken, vorallem nach unserem Umzug nach München. Miguel Lopez de Heredia für seine Hilfsbereitschaft. Jörg Theurer möchte ich danken für die wissenschaftlichen Diskussionen außerhalb des Labors.

Ein ausdrücklicher Dank geht an alle Mitarbeiter des ZMBH, die auch nach unserem Umzug nach München durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit unvergessen bleiben.

10 Zusammenfassung

Die Erzeugung verschiedener Zelltypen ist für einen multizellulären Organismus eine Grundvoraussetzung für seine Entwicklung. Welche Funktionen und Aufgaben die verschiedenen Zellen übernehmen, wird durch eine differentielle Genexpression bestimmt. Ein Mechanismus, um eine Asymmetrie zu erzeugen, ist die räumlich begrenzte Expression von Proteinen durch die Lokalisation von deren mRNA. Die asymmetrische Zellteilung ist nicht nur für multizelluläre Organismen essentiell, man findet sie auch in einzelligen Eukaryonten wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Die Lokalisation der *ASH1* mRNA an die Knospenspitze sich teilender Hefezellen resultiert in einer asymmetrischen Verteilung des GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktors Ash1p. Es handelt sich um einen Myosin-abhängigen Transport eines Ribonucleoprotein-Partikels (RNP) an die kortikale Spitze der Tochterzelle. Möglicherweise handelt es sich hier um eine generelle mRNA Transportmaschinerie, da neben *ASH1* mRNA noch einige andere mRNAs, wie z.B. *IST2* mRNA lokalisiert werden.

Die asymmetrische Verteilung von Ash1p im Zellkern der Tochter verhindert, dass dieselbige ihren Paarungstyp wechselt. In haploiden Hefezellen unterdrückt Ash1p im Tochterzellkern die Expression der *HO*-Endonuclease, ein Enzym das den Paarungstypwechsel in der Hefezelle steuert. Folglich ist nur die haploide Mutterzelle in der Lage ihren Paarungstyp zu wechseln. Ash1p ist jedoch auch in diploiden *S. cerevisiae* Zellen asymmetrisch verteilt und hat eine bislang ungeklärte Rolle in der pseudohyphalen Differenzierung der Hefezellen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich neben der *HO*-Endonuclease ein weiteres Zielgen des GATA-ähnlichen Transkriptionsfaktors *ASH1* identifizieren. Es handelt sich hierbei um das *PHO85*-Cyclin *PCL5*. Pho85-Cyclin Komplexe spielen eine Rolle in der Zellmorphogenese, der Zelldifferenzierung, dem Metabolismus und dem Zellzyklus. Phänotypische Analysen zeigten, daß die Regulation von *PCL5* durch *ASH1* und im weiteren Sinne durch das Myosin *MYO4* in die morphologische Differenzierung der Hefezelle eingreift. Ich konnte des weiteren zeigen, daß die Transkription von *PCL5* Ploidie-spezifisch und Nährstoff-abhängig reguliert wird.

Mit Hilfe von mRNA-Lokalisationstudien und Immunfluoreszenzanalysen konnte ein Modell entwickelt werden. Wir schlagen vor, daß *PCL5* ein Signalgeber zur Beladung des Myo4-Transportmoleküls mit mRNA ist, welches in der korrekten Lokalisation von *ASH1* und *IST2* mRNA in die Tochterzelle resultiert. Die folgende asymmetrische Verteilung der Ash1 und Ist2 Proteine ist somit *PCL5*-abhängig. Pcl5 Protein selbst zeigt ebenfalls eine asymmetrische

Verteilung im Zellkern der Mutter. Diese asymmetrische Verteilung wiederum ist Ploidie-spezifisch *ASH1*- und *MYO4*-abhängig. Ash1p kontrolliert nicht nur die Genexpression von *PCL5* sondern veranlasst auch die Degradation von Pcl5p.

Der Transkriptionsfaktor *ASH1* erlaubt es der diploiden Hefezelle, auf Veränderungen der Umwelt zu reagieren. Eine Antwort auf Umweltveränderungen stellt auch der Dimorphismus vieler Pilze wie *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, daß das *C. albicans* *ASH1*-Homolog (*CaASH1*) in *S.cerevisiae* auf Grund der Lokalisation der *CaASH1* mRNA in die Tochterzelle ebenfalls eine asymmetrische Verteilung des CaAsh1 Proteins vorweist. Komplementierungsstudien zeigten überdies eine konservierte Funktion von *ASH1* in der pseudohyphalen Differenzierung von Hefezellen.

Mit dieser Arbeit konnte so nicht nur ein Fortschritt im Hinblick der Grundlagenforschung der asymmetrischen Zellteilung erbracht werden, sondern es wurde ebenso eine Basis geschaffen für weitere medizinisch relevante Studien hinsichtlich des Dimorphismus des humanpathogenen Pilz *C.albicans*.

11 Summary

The generation of different cell-types is essential for the development of multicellular organisms. Functions and tasks of cells are determined by the differential expression of genes. One mechanism to generate asymmetry is a spatially restricted expression of proteins due to the localisation of their mRNA. Asymmetric cell-division due to mRNA localisation is not only essential for multicellular organisms but also for unicellular eukaryotes like the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

The localisation of *ASH1* mRNA to the bud tip of dividing yeast cells results in an asymmetric distribution of the GATA-like transcription factor Ash1p. The transport of the ribonucleoprotein-particle (RNP) to the cortical tip of the daughter cell is myosin-dependent. It is possible that the *ASH1* mRNA transport machinery is a general mRNA transport machinery, because besides *ASH1* mRNA there are several other mRNAs like *IST2* mRNA which are localized.

The asymmetric distribution of Ash1p to the nucleus of the daughter prevents the mating type switch of the daughter cell. In haploid yeast cells Ash1p is repressing the expression of the *HO* gene in the daughter nucleus. *HO* encodes an endonuclease that induces the mating-type switch of yeast cells. Consequently only mother cells can switch their mating-type. Ash1p is also in diploid *S.cerevisiae* cells asymmetrically distributed and has a so far unknown role in pseudohyphal differentiation of yeast cells.

During my PhD thesis I identified a second target gene of *ASH1*, the *PHO85*-Cyclin *PCL5*. *Pho85*-cyclin complexes play a role in cell morphogenesis, cell differentiation, metabolism and cell cycle. Phenotypic analysis showed that regulation of *PCL5* by *ASH1* and by the myosin *MYO4* is involved in morphological differentiation of yeast cells. Furthermore I could demonstrate, that *PCL5* transcription is ploidy-specific and nutrient-dependently regulated.

Using mRNA localisation studies and immunofluorescence-analysis we suggest a model to explain the relationship between the mRNA localisation machinery and a cyclin. We propose that *PCL5* gives a signal for loading the *MYO4* transport complex with mRNA, which results in correct localisation of *ASH1* and *IST2* mRNA to the daughter cell. The consequent asymmetric distribution of Ash1 and Ist2 protein is *PCL5* dependent. The Pcl5 protein on its own, shows also an asymmetric distribution. Pcl5p is only found in the nucleus of the mother cell. This asymmetric distribution is ploidy-specific *ASH1*- and *MYO4*- dependent. Ash1p not only controls gene expression of *PCL5* but also stimulates the degradation of Pcl5p.

The transcription factor *ASH1* permits diploid yeast cells to react to environmental changes. One response to changes in the environment of a cell is dimorphism as found in fungi like *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*.

I could demonstrate that the *C.albicans* Ash1p-homologue (*CaAsh1p*) when expressed in *S.cerevisiae* is asymmetrical distributed due to the localisation of the *CaASH1* mRNA to the daughter cell. Complementation studies showed that *CaASH1* has a conserved function, concerning the pseudohyphal differentiation of yeast cells.

This PhD thesis is not only a progress in regard of basic research of asymmetrical cell division but also set the ground for further medical relevant studies concerning the dimorphism of the humanpathogen *C.albicans*.