

Jutta Schüller: Analysen ausgewählter Holoenzymkomponenten in *Saccharomyces cerevisiae*. 2001

Gal11p wurde als limitierender Faktor der Transkription des GAL1-Genes identifiziert. Seine Überexpression aktiviert die Transkription, obwohl Gal11p keine DNA-bindende Domäne besitzt. Es konnte gezeigt werden, daß Gal11p mit Gal4p, dem Aktivator des GAL1-Genes, in vivo interagiert. Mit Hilfe von zwei zuvor isolierten Gal11p-Mutanten, F869S und F848L, welche die Fähigkeit zur Aktivierung nicht mehr besitzen, wurde nach dem Rezipienten von Gal11p gesucht. Es zeigte sich, daß Tfg3p zwar mit Gal11p, aber nicht mit den beiden Gal11p-Mutanten interagiert. Die Phänotypen von GAL11- und TFG3-Deletionsstämmen sind sich sehr ähnlich. Beide zeigen Defekte in der Transkriptionsregulation.

Um die Funktion des negativen Regulators der Transkription Srb8p zu untersuchen wurde mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems nach interagierenden Proteinen gesucht. Die von den bis dahin hypothetische ORFs YMR098c und YJL109c kodierte Proteine wurden als Interaktionspartner von Srb8p identifiziert. Aufgrund ihrer Interaktion mit Srb8p wurden sie als Ips1p bzw. Ips2p ("interacting partner of Srb8p") bezeichnet. Beide besitzen keine bekannten funktionellen Domänen und keinerlei Ähnlichkeit mit bisher bekannten Proteinen. Es konnte gezeigt werden, daß Ips2p ein essentielles Protein ist. Ips2p interagiert im Split-Ubiquitin-System mit Srb8p. Die Funktion von Ips1p wurde in einem Deletionsstamm und in einem Stamm, in dem zusätzlich SRB8 deletiert war, untersucht. Ips1p ist für die Transkription von einigen der untersuchten Gene wie GAL1, SUC2, MFA1 und STE2, notwendig. Eine Interaktion zwischen Srb8p und Ips1p im Split-Ubiquitin-System konnte nicht gezeigt werden. In vitro konnte eine Interaktion zwischen Ips2p und Ips1p sowie eine Di- oder Oligomerisierung von Ips1p gezeigt werden.

Um die Aufgaben der verschiedenen Proteine des Srb11p/Srb10p-Cyclin/CDK-Paares im funktionellen Zusammenhang mit dem Tup1p/Ssn6p Korepressorkomplex zu untersuchen, wurden die einzelnen Protein-Protein-Interaktionen in vivo und in vitro analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß eine Interaktion zwischen Tup1p und Srb11p stattfindet. Diese Interaktion ist von Relevanz für die Transkription einiger der analysierten Gene, wie z.B. GAL1, SUC2, MFA1 und STE2.

Gal11p was identified as a limiting factor for the transcription of the GAL1-promoter. Even without being tethered directly to DNA, overexpression of Gal11p activates transcription. An interaction between Gal11p and Gal4p was detected in the split-ubiquitin system. Two Gal11p-mutants, F869L and F848L, which had been identified previously, lost their ability to activate transcription upon overexpression. These mutants were used to search for a protein downstream of Gal11p. Tfg3p interacts with Gal11p, but does not do so with the mutants F869S and F848L. The phenotype of a GAL11-deletion strain is similar to a TFG3-deletion strain. Also, both deletion strains display defects in transcriptional regulation.

In order to analyze the function of Srb8p, a negative regulator of transcription, a two-hybrid screen was performed. Two hypothetical ORFs, YMR098c and YJL109c, were identified. Due to their ability to interact with Srb8p, they were named IPS1 and IPS2 ("interacting partner of Srb8p 1 and 2"). Neither protein displays any known functional domains or similarities to previously identified proteins. Ips2p was found to be essential. The function of Ips1p was analyzed by means of an IPS1-deletion strain and with the help of a strain deleted for both IPS1 and SRB8. Ips1p is necessary for the transcription of some of the analyzed genes like GAL1, SUC2, MFA1 or STE2. In the split-ubiquitin system, the interaction between Ips1p and Srb8p could not be confirmed. However, the interaction between Ips2 and Srb8p could be verified by using the split-ubiquitin system. Also, Ips1p and Ips2p interact in vitro. Furthermore, a di- or oligomerization of Ips1p could be shown.

In order to analyze the functions of the different proteins of the Srb11p/Srb10p-cyclin/CDK-pair in regard to their connection with the Tup1p/Ssn6p corepressor complex, the interactions of the proteins with each other were studied in vivo as well as in vitro. It could be shown that an interaction occurs

between Tup1p and Srb11p. This interaction is of significance for the transcription of some of the analyzed genes like GAL1, SUC2, MFA1 or STE2.