



Regulation der Sporenzahl durch Bicarbonat und  
den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg in  
*Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. Nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Marc Jungbluth

aus Meschede

Marburg an der Lahn, September 2011

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
am \_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Tag der mündlichen Prüfung am \_\_\_\_\_.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch und unter Betreuung von Dr. Christof Taxis im Zeitraum von September 2007 bis September 2011 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Jungbluth, M., Renicke, C. & Taxis, C. Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Systems Biology* 4 (2010).

In Bearbeitung:

Jungbluth, M., Mösch, H.-U., Taxis, C. Meiotic spore number control by Ras and bicarbonate-dependent feedback regulation of PKA in *Saccharomyces cerevisiae*.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Regulation der Sporenzahl durch Bicarbonat und den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg in *Saccharomyces cerevisiae*“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Marc Jungbluth)

## *Meinen Eltern gewidmet*

*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“*

Isaac Newton (1643-1727)  
englischer Physiker, Mathematiker und Astronom

## Zusammenfassung

Die Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* wird unter spezifischen Nährstoffmangelbedingungen induziert und setzt sich aus der Meiose und anschließenden Bildung von Ascosporen zusammen. Im Laufe der Sporulation entsteht aus einer diploiden Mutterzelle ein Ascus, der bis zu vier Ascosporen enthalten kann. Die Zahl der gebildeten Sporen hängt von der Nährstoffsituation ab, die maximale Anzahl von vier Sporen pro Zelle wird nur gebildet, wenn genügend Nährstoffe, zum Beispiel Kaliumacetat, zur Verfügung stehen. Diese Anpassung der Sporenzahl an die Nährstoffbedingungen wird Sporenzahlkontrolle genannt. Es ist nicht bekannt, wie das Nährstoffsignal wahrgenommen und in eine Adaption der Sporenzahl umgesetzt wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg, der essentiell für das vegetative Wachstum und die Initiation der Sporulation ist, auch an der Regulation der Sporenzahl beteiligt ist. Um Schlüsselkomponenten des Signaltransduktionsweges gezielt während der Meiose auszuschalten, wurde eine Methode so modifiziert, dass sie die Meiose-spezifische Destabilisierung von Proteinen erlaubt. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg einen negativen Einfluss auf die Sporenbildung hat. Die erhobenen Daten deuten daraufhin, dass die Aktivität der Adenylylzyklase Cyr1 während des vegetativen Wachstums durch Bicarbonat positiv, während der Sporulation hingegen negativ beeinflusst wird. Weiterhin hat sich gezeigt, dass neben der Modulation auch die zeitliche Koordinierung der PKA-Aktivität wichtig für die Sporenzahlkontrolle ist. Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen geringer PKA-Aktivität und einer Erhöhung der Zell- und Ascusgröße aufgestellt werden. Ein mögliches, während der Meiose von PKA reguliertes Ziel ist das Protein Ady1. Es konnte eine genetische Interaktion zwischen Ady1 und Komponenten des Spindelpolkörpers identifiziert werden. Zusammenfassend hat diese Arbeit gezeigt, dass die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges während der Sporulation durch die Ras-Proteine und Bicarbonat reguliert wird. Auf diese Weise erzeugen unterschiedliche Acetatmengen unterschiedlich hohe PKA-Aktivität, was zu einer Anpassung der Sporenzahl an die Nährstoffbedingungen führt.

## Summary

Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* is induced under specific conditions of nutrient deficiency and consists of meiosis and the subsequent formation of ascospores. In the course of sporulation a diploid mother cell transforms into an ascus, which contains up to four ascospores. The number of spores formed depends on the nutritional situation, the maximum number of four spores per cell is only formed when adequate nutrients, for example potassium acetate, are available. This adjustment of spore numbers to the nutrient conditions is called spore number control. It is not known how the nutrient signal is perceived and converted into an adaptation of spore numbers. In this study it was shown that the cAMP/PKA signaling pathway, which is essential for vegetative growth and the initiation of sporulation, is also involved in the regulation of spore numbers. To inactivate key components of the signal transduction pathway during meiosis, a method was modified to allow meiosis-specific destabilization of proteins. Using this method it was shown that the cAMP/PKA signaling pathway has a negative influence on spore formation. The data collected indicate that the activity of the adenylyl cyclase Cyr1 is influenced by bicarbonate positively during vegetative growth and negatively during sporulation. Furthermore, it has been shown that in addition to the modulation, the temporal coordination of PKA activity is important for spore number control. Additionally to the influence on spore number control, a correlation between low PKA activity and an increase in cell and ascus size was identified. A possible, meiosis specific target of PKA is the protein Ady1. A genetic interaction between Ady1 and components of the spindle pole bodies was identified. In summary, this work has shown that the activity of the cAMP/PKA signaling pathway is regulated by the Ras proteins and bicarbonate during sporulation. By this, varying acetate concentrations lead to differences in PKA activity, which consequently lead to the adjustment of spore numbers to the nutrient conditions.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

(d)dH <sub>2</sub> O	(voll) entsalztes Wasser
(k)bp	(Kilo) Basenpaare
5-FOA	5-Fluororotsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintri-phosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
<i>carnitine shuttle</i>	Acylcarnitin/Carnitin-Transportsystem
<i>commitment</i>	Eintrittsverpflichtung in die Meiose; zeitlich zwischen Ende Prophase I und Anfang Meiose I
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Erhöhte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
<i>et al.</i>	„und andere“
EtOH	Ethanol
Gal	Galaktose
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
GTP	Guanosintri-phosphat
HA	Haemagglutinin
HCl	Hydrochlorid
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonation
HRP	Meerrettich Peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
KOAc	Kaliumacetat
LB	„Lysogeny Broth“ komplexes Nährmedium für <i>E. coli</i>
m	milli
M	Stoffmengenkonzentration in mol/l
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase



mating type (Mat)	Kreuzungs-/ oder Geschlechtstyp
Meiose I	Erste meiotische Teilung
Meiose II	Zweite meiotische Teilung
min	Minute
MP	Meiotische Platte
NADH	Hydratisierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Potentia hydrogenii
PKA	Proteinkinase A
Primer	Oligonukleotid
<i>pTEV</i> <sup>+</sup>	Gen, das für die veränderte TEV-Protease kodiert. <i>p</i> : <i>p14</i> <sup>D122Y</sup> , +: STOP-Codon an Stelle 234
Raff	Raffinose
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SC	„Synthetic complete“ synth. Nährmedium für <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Shmoo	Ausbuchtung bei haploiden Hefezellen, die sich vor der Kreuzung bildet
SORB	Sorbitol
SPB	Spindelpolkörper
SPO	Sporulation
taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS(T)	Tris-gepufferte Salzlösung (mit Tween 20)
TCA-Zyklus	Citratzyklus
TDegF	TEV-Protease aktivierbares Degron mit Phenylalanin als N-Terminale Aminosäure nach Proteolyse durch TEV-Protease
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	Tabak-Ätz-Virus
TIPI	TEV-Protease induzierte Proteininstabilität
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
Ub	Ubiquitin

UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
xg	Das x-Fache der Erdbeschleunigung g (9,81 m/s <sup>2</sup> )
YP	„Yeast extract + Peptone“
YPD	„Yeast extract + Peptone + Dextrose“
YPG	„Yeast extract + Peptone + Glycerin“
Z-Stapel	Aufnahme mehrerer Bilder in Z-Richtung
°C	Grad Celsius
%	Prozent
α	alpha
μ	micro
Δ	Delta (kennzeichnet die Deletion eines Gens)

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Lebenszyklus von <i>S. cerevisiae</i> .....	2
Abbildung 2: Sporulation in <i>S. cerevisiae</i> .....	4
Abbildung 3: Regulation des Eintritts in die Meiose durch Signaltransduktionswege .....	7
Abbildung 4: Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg .....	12
Abbildung 5: Transkriptionelle Regulation der Meiose.....	16
Abbildung 6: Das TEV-Protease-induzierte-Proteininstabilitäts-System (TIPI-System) .....	25
Abbildung 7: Herstellung Meiose-spezifischer Mutanten mit Hilfe des TIPI-Systems .....	28
Abbildung 8: Meiose-spezifische Depletion von Ras1 .....	29
Abbildung 9: Lokalisation von TDegF-Ras1 und -Ras2 in vegetativ wachsenden Zellen .....	31
Abbildung 10: Auswirkungen der Meiose-spezifischen Depletion von Ras1 und Ras2 auf die Sporulation .....	32
Abbildung 11: Auswirkung der Tpk-Depletion auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle.....	35
Abbildung 12: Einfluss der Deletion von <i>GPR1</i> und <i>GPA2</i> auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle.....	37
Abbildung 13: Lokalisation des Bcy1-Degradationskonstruktes in vegetativ wachsenden Zellen.....	38
Abbildung 14: Einfluss der Meiose-spezifischen Depletion von Bcy1 auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle .....	39
Abbildung 15: Auswirkungen der Expression von <i>RAS2<sup>G19V</sup></i> unter Kontrolle des <i>RAS2</i> -, <i>IME2</i> - oder <i>SPS1</i> -Promotors auf die Sporulation .....	42
Abbildung 16: Einfluss von Hydrogencarbonat auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle .....	44
Abbildung 17: Einfluss von Bicarbonat auf die Sporulation einer <i>ady1Δ</i> -Mutante und einer Mutante mit reduzierten MP-Proteinmengen .....	45
Abbildung 18: Die Deletion von <i>NCE103</i> führt zu einem Wachstumsdefekt bei Wachstum in normaler Luft .....	46
Abbildung 19: Auswirkungen der Deletion von <i>NCE103</i> auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle ..	47
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Cyr1 aus <i>S. cerevisiae</i> und partieller Sequenzvergleich der Adenylzyklasen aus <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. albicans</i> und <i>Anabaena sp.</i> .....	48
Abbildung 21: Färbung von <i>cyr1</i> - und <i>ady2Δ cyr1</i> -Mutanten über Joddämpfen .....	49
Abbildung 22: Der Einfluss der <i>cyr1<sup>K1712A</sup></i> - und der <i>cyr1<sup>K1876M</sup></i> -Mutation auf die Sporulation .....	50
Abbildung 23: Bestimmung der Ascusgröße nach der Sporulation und der Zellgröße während des vegetativen Wachstums von <i>cyr1</i> - und <i>ady2Δ cyr1</i> -Mutanten .....	52
Abbildung 24: Überprüfung der Alkalisierung des Sporulationsmediums .....	53
Abbildung 25: Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat auf die Lokalisation von Msn2 in vegetativ wachsenden Zellen .....	55
Abbildung 26: Western-Analyse zur Bestimmung der Proteinmenge von Mpc54, Mpc70 und Spo74 in <i>ady1Δ</i> -Mutanten und Kontrollstämmen.....	57
Abbildung 27: Untersuchung der meiotischen Teilungen und der Bildung von meiotischen Platten in <i>ady1Δ SPO74-GFP</i> - und <i>ady1Δ MPC70-GFP</i> -Mutanten .....	58

Abbildung 28: Auswirkungen der heterozygoten Deletion von *MPC54*, *MPC70* oder *SPO74* in einem *ady1Δ*-Stamm ..... 59

Abbildung 29: Modellvorstellung zur Regulation der Sporenzahl durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg ..... 76

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>Summary.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungen und Fachbegriffe .....</b>	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Bäckerhefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Sporulation in <i>S. cerevisiae</i>.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Bildung von Sporen durch Meiose und Sporenbildung .....	3
1.2.2 Regulation des Eintritts in die Sporulation durch Signaltransduktionswege .....	6
1.2.2.1 Der Tor2-Signaltransduktionsweg.....	7
1.2.2.2 Der Rim101-Signaltransduktionsweg.....	8
1.2.2.3 Der Glukose-Repressions-Signaltransduktionsweg.....	9
1.2.2.4 Der Rgt1-Signaltransduktionsweg.....	10
1.2.2.5 Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg .....	10
1.2.3 Transkriptionelle Regulation der Sporulation .....	16
1.2.4 Acetat-Stoffwechsel während der Sporulation.....	19
1.2.5 Regulation der Sporenzahl .....	20
<b>1.3 Regulation der Proteinmenge durch das TEV-Protease-induzierte- Proteininstabilitätssystem (TIPI-System).....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>26</b>
<b>2 Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Modifizierung des TIPI-Systems zur Erzeugung Meiose-spezifischer Mutanten .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Modulation der PKA-Aktivität während der Meiose.....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Verringerung der PKA-Aktivität durch Depletion der Cyr1 Effektoren Ras1 und Ras2.....	30
2.2.2 Verringerung der PKA-Aktivität durch Depletion der katalytischen PKA- Untereinheiten .....	34
2.2.3 Verringerung der PKA-Aktivität durch Depletion von Cyr1 .....	36

2.2.4	Einfluss des G-Protein-gekoppelten Glukoserezeptors Gpr1 und des G-Proteins Gpa2 auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle .....	37
2.2.5	Erhöhung der PKA-Aktivität durch Depletion der regulatorischen PKA-Untereinheit Bcy1.....	38
2.2.6	Erhöhung der PKA-Aktivität durch Expression der dominant-aktiven <i>RAS2<sup>G19V</sup></i> -Variante .....	40
<b>2.3</b>	<b>Einfluss der Regulation von Cyr1 durch Bicarbonat auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle .....</b>	<b>43</b>
2.3.1	Einfluss der Carbonanhydrase Nce103 auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle.....	46
2.3.2	Einfluss von <i>cyr1</i> -Mutationen auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle.....	47
2.3.3	Einfluss des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges auf die Zell- und Ascusgröße .....	51
2.3.4	Einfluss des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges auf den Acetatstoffwechsel .....	52
<b>2.4</b>	<b>Untersuchung des Einflusses verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat auf die Msn2-Lokalisation .....</b>	<b>54</b>
<b>2.5</b>	<b>Einfluss von Ady1 auf die Regulation der MP-Proteinmenge und den Aufbau der meiotischen Platte .....</b>	<b>56</b>
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
3.1	Meiose-spezifische Regulation der Proteinmenge durch das TIPI-System .....	60
3.2	Wahrnehmung und Weiterleitung des Acetatsignals während der Sporulation .....	61
3.2.1	Während der Sporulation dient Bicarbonat als Maß der Acetatverfügbarkeit und übt einen negativen Einfluss auf Cyr1 aus .....	62
3.3	Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges ist essentiell für die Regulation der Sporezahl.....	67
3.3.1	Modulation und zeitliche Koordinierung sind für die Regulation der Sporezahl essentiell .....	72
3.4	Die PKA-Aktivität beeinflusst Zell- und Ascusgröße .....	74
3.5	Modellvorstellung zur Regulation der Sporezahl durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg .....	75
3.6	Ausblick .....	77
<b>4</b>	<b>Material .....</b>	<b>80</b>
4.1	Bezugsquellen von Chemikalien, Enzymen und Kits .....	80

4.1.1	Lösungen und Puffer .....	81
4.1.2	Antibiotika.....	83
4.1.3	Nährmedien .....	83
<b>4.2</b>	<b>Stämme und Plasmide .....</b>	<b>85</b>
4.2.1	<i>E. coli</i> Stämme .....	85
4.2.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme.....	85
4.2.3	Plasmide .....	95
4.2.4	Oligonukleotide.....	97
4.2.5	Antikörper .....	103
4.2.6	Polyacrylamidgele.....	103
<b>5</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>104</b>
<b>5.1</b>	<b>Wachstumsbedingungen .....</b>	<b>104</b>
5.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	104
5.1.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	104
5.1.2.1	Kultivierung der <i>nce103</i> Δ-Mutante.....	104
5.1.2.2	Sporulation von <i>S. cerevisiae</i> .....	105
5.1.3	Messung der optischen Dichte in Flüssigkulturen.....	106
5.1.4	Färbung von <i>S. cerevisiae</i> Zellen mit Jod-Dämpfen .....	106
5.1.5	Induktion der <i>cre</i> -Rekombinase .....	106
5.1.6	Bestimmung der Lokalisation von Msn2-GFP.....	107
<b>5.2</b>	<b>Hoechst-Färbung von <i>S. cerevisiae</i> Zellen .....</b>	<b>108</b>
<b>5.3</b>	<b>Auswertung der Sporulation und Bestimmung der Sporulationseffizienz .....</b>	<b>108</b>
<b>5.4</b>	<b>Tetradendisektion .....</b>	<b>109</b>
<b>5.5</b>	<b>Bestimmung des Paarungstyps .....</b>	<b>109</b>
5.5.1	Überprüfung des Paarungstyps durch Kreuzung mit Tester-Stämmen .....	110
5.5.2	Überprüfung des Paarungstyps durch PCR.....	110
<b>5.6</b>	<b>Bestimmung der Zell- und Ascusgröße durch Impedanzmessung.....</b>	<b>111</b>
<b>5.7</b>	<b>Transformation von DNA .....</b>	<b>112</b>
5.7.1	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	112
5.7.2	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen .....	112
5.7.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	112
<b>5.8</b>	<b>Isolierung und Manipulation von DNA .....</b>	<b>113</b>
5.8.1	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	113
5.8.2	DNA-Isolierung aus <i>S. cerevisiae</i> .....	113
5.8.3	DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	114
5.8.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten.....	116

5.8.5	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	116
5.8.6	Enzymatische Restriktion von DNA .....	116
5.8.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	116
5.8.8	Ligation von DNA.....	116
5.8.9	<i>In vivo</i> Ligation in <i>S. cerevisiae</i> .....	117
5.8.10	Chromosomale Integration von DNA in <i>S. cerevisiae</i> .....	117
5.8.11	Sequenzierung von DNA .....	117
<b>5.9</b>	<b>Proteinanalyse und –detektion .....</b>	<b>117</b>
5.9.1	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> .....	117
5.9.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	118
5.9.3	Immunodetektion von Protein.....	118
5.9.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	119
<b>5.10</b>	<b>Software.....</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>140</b>

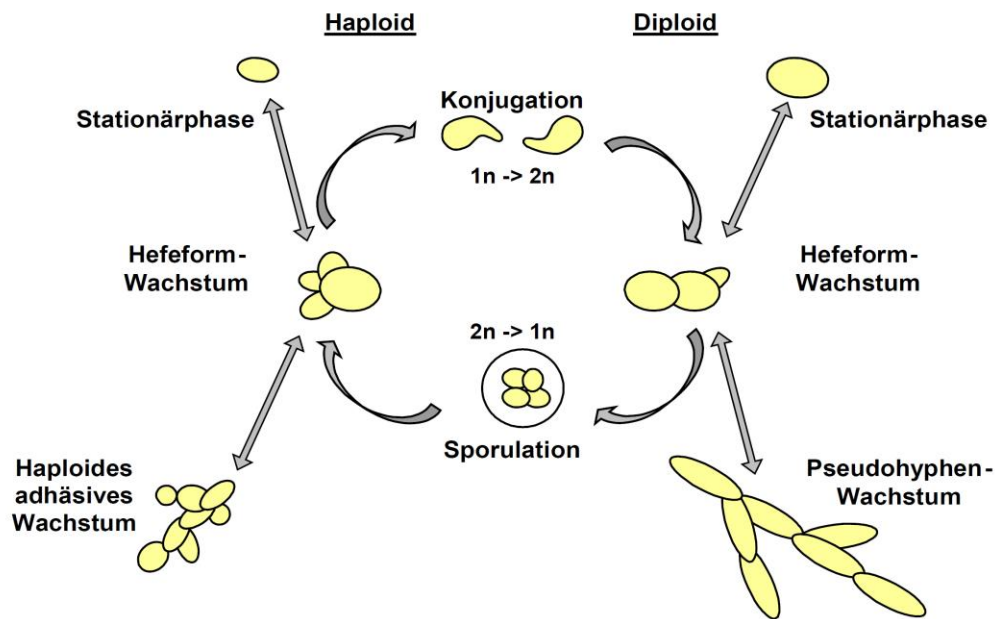


# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein Hemiascomycet und gehört zur Gattung der *Saccharomyces* (Zuckerhefen). *S. cerevisiae* ist der biotechnologisch am längsten genutzte Mikroorganismus. Seit Jahrtausenden wird *S. cerevisiae* wegen der Fähigkeit zur alkoholischen Gärung, bei der Kohlenhydrate zu Ethanol und CO<sub>2</sub> umgesetzt werden, bei der Herstellung von Backwaren und alkoholhaltigen Getränken, wie Wein und Bier, verwendet. Darüber hinaus ist *S. cerevisiae* ein wichtiger eukaryotischer Modellorganismus für die molekularbiologische Forschung. Vor allem die einfache Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen, eine kurze Generationszeit, die leichte genetische Zugänglichkeit und nicht zuletzt das komplett sequenzierte Genom (Goffeau *et al.*, 1996) machen *S. cerevisiae* zu einem idealen Organismus um grundlegende biologische Fragestellungen zu beantworten. Da die interne Zellstruktur der Bäckerhefe mit derjenigen anderer eukaryotischer Zellen verwandt ist, lassen sich Forschungsergebnisse oft direkt auf höhere eukaryotische Zellen übertragen. So wurde *S. cerevisiae* zur Erforschung des eukaryotischen Zellzyklus (Hartwell *et al.*, 1970) oder des Proteinabbaus (Achstetter and Wolf, 1985; Ciechanover *et al.*, 1984) verwendet. Die Daten, die durch die Sequenzierung des Genoms und darauf folgende genomweite Analysen gewonnen wurden, sind heute für jeden in der *Saccharomyces Genome Database* zugänglich (<http://www.yeastgenome.org>).

Hefezellen vermehren sich sowohl in haploider, als auch in diploider Form durch Knospung (Abbildung 1). Diese Art der Vermehrung findet in der Hefeform bei ausreichender Nährstoffversorgung statt. Sowohl haploide, als auch diploide Zellen weisen unter Nährstoffmangelbedingungen ein spezielles Wachstumsverhalten auf. Bei Stickstoffmangel und Anwesenheit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen diploide Hefezellen pseudohyphal (Gimeno and Fink, 1992; Gimeno *et al.*, 1992). Diese Wachstumsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen elongiert sind und sich nach dem Knospen nicht voneinander trennen. In haploiden Zellen lässt sich unter bestimmten Nährstoff-Mangelbedingungen wie Glukosemangel ein ähnlicher Phänotyp, das haploid adhäsive Wachstum, beobachten (Sprague *et al.*, 2004). Das haploid adhäsive Wachstum kennzeichnet sich ebenfalls durch eine Verlängerung der Zellen



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

Hefezellen vermehren sich in haploider und diploider Form durch Knospung. Haploide Zellen werden durch Konjugation zu diploiden Zellen, diploide Zellen durch Sporulation wieder zu haploiden. In Abwesenheit einer Kohlenstoffquelle überdauern sowohl haploide, als auch diploide Zellen die Mangelbedingungen in der Stationärphase (G<sub>0</sub>). Unter Stickstoffmangelbedingungen bilden diploide Zellen filamentöse Pseudohyphen, ein ähnliches Wachstumsverhalten, das haploid adhäsives Wachstum tritt bei haploiden Zellen auf.

und dadurch, dass sich die Zellen nach der Knospung nicht voneinander trennen. Sowohl haploide, als auch diploide Zellen arretieren ihren Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase, wenn keine verwertbaren Kohlenstoffquellen mehr vorhanden sind. Die Zellen überdauern daraufhin den Zeitraum der Nährstoffarmut in der stationären Phase (G<sub>0</sub>). Haploide Hefezellen kommen in den Geschlechtstypen MAT<sub>a</sub> und MAT<sub>α</sub> vor. Zellen unterschiedlichen Geschlechtstyps erkennen sich durch ein Pheromon-Pheromonrezeptor-System (Leberer *et al.*, 1997), wachsen aufeinander zu, wobei sie einen sogenannten „Shmoo“ bilden und in direkten Zell-Zell-Kontakt kommen. Sie fusionieren daraufhin und bilden durch Plasmogamie und Karyogamie eine diploide Zelle. Die Rückkehr vom diploiden zum haploiden Lebensstil geschieht durch den Prozess der Sporulation, der in Abwesenheit von Glukose und anderen essentiellen Nährstoffen und in Anwesenheit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle eingeleitet wird. Die Sporulation setzt sich aus den zwei meiotischen Teilungen und der anschließenden Bildung von Ascosporen zusammen und findet komplett in der Mutterzelle statt, die nach der Sporulation Ascus genannt wird und bis zu vier haploide Ascosporen enthalten kann. Verbessern sich die Nährstoffbedingungen, keimen die Ascosporen aus und vermehren sich entweder durch Knospung in der Hefeform oder bilden durch Konjugation wieder diploide Zellen (Sherman, 2002).

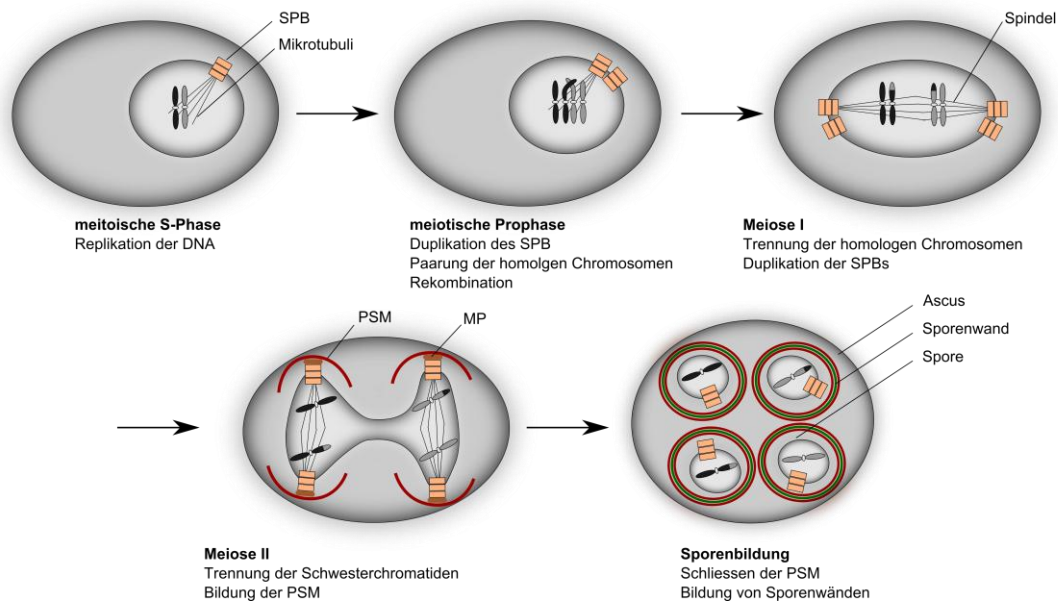
## 1.2 Die Sporulation in *S. cerevisiae*

### 1.2.1 Bildung von Sporen durch Meiose und Sporenbildung

Der Wechsel vom diploiden zum haploiden Lebensstil wird in *S. cerevisiae* durch den entwicklungsbiologischen Prozess der Sporulation vollzogen (Kupiec *et al.*, 1997). Die Sporulation setzt sich aus den Prozessen Meiose und Sporenbildung zusammen und resultiert in der Bildung eines Ascus, der bis zu vier Ascosporen, mit je einem haploiden Genom enthalten kann (Esposito and Klapholz, 1981). Die Sporulation wird unter spezifischen Nährstoffmangelbedingungen eingeleitet. Erstens muss ein Mangel an Glukose herrschen. Selbst geringe Glukose-Konzentrationen von 0,2 bis 0,5 % führen zu einer Repression der Sporulation (Honigberg and Purnapatre, 2003). Zusätzlich muss mindestens ein essentieller Nährstoff wie Stickstoff, Phosphat oder Sulfat fehlen. Es ist nicht sicher, ob Stickstoff einen direkten Einfluss auf die Repression der Sporulation hat oder das Fehlen von Stickstoff durch den daraus folgenden G1-Arrest indirekt die Initiation der Meiose begünstigt. Wenn andere wichtige Nährstoffe fehlen und Stickstoff anwesend ist, wird trotzdem die Meiose initiiert, was für eine indirekte Rolle von Stickstoff sprechen würde (Freese *et al.*, 1982; Freese *et al.*, 1984). Zusätzlich zu diesen Bedingungen muss eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle, wie zum Beispiel Kaliumacetat, zur Verfügung stehen.

Die Sporulation (Abbildung 2) beginnt mit der Meiose, die in *S. cerevisiae*, wie auch in allen anderen Eukaryoten der sexuellen Reproduktion dient und durch Rekombinationsereignisse zwischen homologen Chromosomen die genetische Variabilität sicherstellt. Die Meiose beginnt mit der meiotischen S-Phase, in der die Replikation der DNA stattfindet. In der darauf folgenden meiotischen Prophase I paaren sich die homologen Chromosomen und es finden Rekombinationsereignisse statt. Nach der Rekombination folgen die zwei meiotischen Teilungen, Meiose I und Meiose II, die zur Bildung von vier haploiden Chromosomensätzen führen. Das meiotische Programm kann noch nach der Initiation wieder abgebrochen werden, wenn Nährstoffe zur Verfügung stehen, die vegetatives Wachstum ermöglichen. Die Zellen vollenden dann frühe meiotische Prozesse, wie Replikation und Rekombination, darauf folgt dann allerdings eine mitotische Teilung, so dass zwei diploide Zellen entstehen (Friedlander *et al.*, 2006; Zenvirth *et al.*, 1997). Dieser Wechsel von der Meiose zum mitotischen Wachstum ist allerdings nur bis zu einem bestimmten Punkt, dem sogenannten

*commitment to meiosis* (in etwa: Eintrittsverpflichtung in die Meiose) möglich (Friedlander *et al.*, 2006; Simchen *et al.*, 1972). Zellen vollenden das meiotische Programm selbst in Anwesenheit wachstumsfördernder Nährstoffe, wenn sie den Zeitpunkt des *commitments*, der zwischen Ende der Prophase I und vor der ersten meiotischen Teilung liegt, überschritten haben (Friedlander *et al.*, 2006; Simchen, 2009).



### Abbildung 2: Sporulation in *S. cerevisiae*

Schematische Darstellung der Sporulation in *S. cerevisiae*. In der S-Phase der Meiose wird die DNA repliziert. In der Prophase paaren sich die homologen Chromosomen und es findet Rekombination statt. Der Spindelpolkkörper (SPB) wird dupliziert. In der ersten meiotischen Teilung werden die homologen Chromosomen voneinander getrennt. Die SPBs werden erneut dupliziert. In der zweiten meiotischen Teilung werden die Schwesterchromatiden voneinander getrennt. Die SPBs werden mit der meiotischen Platte (MP) modifiziert, es bildet sich die Prosorenenmembran (PSM). Nach der zweiten meiotischen Teilung schließt sich die PSM um die haploiden Genome und es kommt zur Einlagerung von Sporenwandmaterial zwischen die zwei Membranen der PSM.

Die Meiose in *S. cerevisiae* ist, wie auch die Mitose (Byers and Goetsch, 1975), geschlossen, das bedeutet, dass die meiotischen Teilungen komplett innerhalb der Kernmembran stattfinden, die sich während dieser Prozesse nicht auflöst (Heywood and Magee, 1976). Bei der Verteilung der Chromosomen während der meiotischen Teilungen spielen die Spindelpolkkörper (*spindle pole bodies*; SPBs) eine wichtige Rolle. Die Spindelpolkkörper entsprechen funktionell den Zentrosomen in Säugetieren und sind für die Organisation der meiotischen Spindel und der cytoplasmatischen Mikrotubuli verantwortlich. Der Spindelpolkkörper in *S. cerevisiae* ist Multiproteinkomplex, der aus drei funktionellen Einheiten besteht. Die zentrale Einheit ist in der Kernmembran eingebettet und verbindet die innere mit der äußeren Einheit, die die meiotische Spindel, beziehungsweise die cytoplasmatischen Mikrotubuli organisieren. In der G1-Phase des mitotischen Zellzyklus ist ein Spindelpolkkörper vorhanden, dieser wird vor der ersten

meiotischen Teilung dupliziert, wodurch zwei Pole der meiotischen Spindel entstehen. Während der ersten meiotischen Teilung werden die homologen Chromosomen durch diese Anordnung voneinander getrennt. Nach Ende der ersten meiotischen Teilung werden die beiden Spindelpolkörper erneut dupliziert, folglich entstehen vier Pole, die paarweise mit einer meiotischen Spindel verbunden sind. Die Schwesterchromatiden werden während der zweiten meiotischen Teilung jeweils zu einem dieser vier Pole gezogen. Die Chromosomen segregieren unter Mitwirkung Mikrotubuli abhängiger, molekularer Motoren (Hoyt, 1994; Hoyt *et al.*, 1992).

An die meiotischen Teilungen schließt sich die Morphogenese der Sporen an (Neiman, 2005), während der die vier haploiden Genome in Sporen verpackt werden, die sie vor äußeren Umwelteinflüssen schützen (Coluccio *et al.*, 2008; Smits *et al.*, 2001). Die Morphogenese der Sporen beginnt mit der Modifikation der Spindelpolkörper mit einer Meiose-spezifischen Struktur, der sogenannten meiotischen Platte (MP). Die meiotische Platte besteht aus den vier Proteinen Mpc54, Mpc70, Spo74 und Ady4, wobei nur die ersten drei für ihre Bildung essentiell sind. Die MP-Proteine werden durch Interaktion mit den konstitutiven SPB-Komponenten Cnm67 und Nud1 an den Spindelpolkörper rekrutiert und ersetzen nach der zweiten meiotischen Teilung das Protein Spc72, das für die Organisation der cytoplasmatischen Mikrotubuli verantwortlich ist. Die Entfernung von Spc72 vom Spindelpolkörper ist eine wichtige Voraussetzung für die Bildung der meiotischen Platte, da die MP-Proteine nur an Nud1 binden können, und wird auch als Aktivierung des Spindelpolkörpers bezeichnet (Bajgier *et al.*, 2001; Gordon *et al.*, 2006; Knop and Strasser, 2000; Nickas *et al.*, 2003). Die meiotische Platte dient dem Anlagern und der Fusion von Golgi-Vesikeln, was zur Bildung der sogenannten Prosporenmembran führt (Moreno-Borchart and Knop, 2003; Shimoda, 2004), die *de novo* synthetisiert wird (Moens, 1971; Moens and Rapport, 1971; Neiman, 1998). Die Prosporenmembran ist die zukünftige Plasmamembran der sich entwickelnden Spore (Moens, 1971; Moens and Rapport, 1971; Peterson *et al.*, 1972) und bildet sich nur an Spindelpolkörpern, die vorher mit einer meiotischen Platte modifiziert wurden. Die Prosporenmembran hat zu Beginn ihrer Bildung eine flache Struktur, die sich im weiteren Verlauf ihrer Bildung verlängert und um Teile des Cytoplasmas und des Zellkerns herum wächst. Wenn sich der Zellkern nach Beendigung der zweiten meiotischen Teilung teilt, schließt sich die Prosporenmembran. Dies resultiert in der Bildung von vier Tochterzellen (Prosporen), die je ein haploides Genom, Cytoplasma und alle zellulären Organellen enthalten. Die Bildung der meiotischen Platte und die

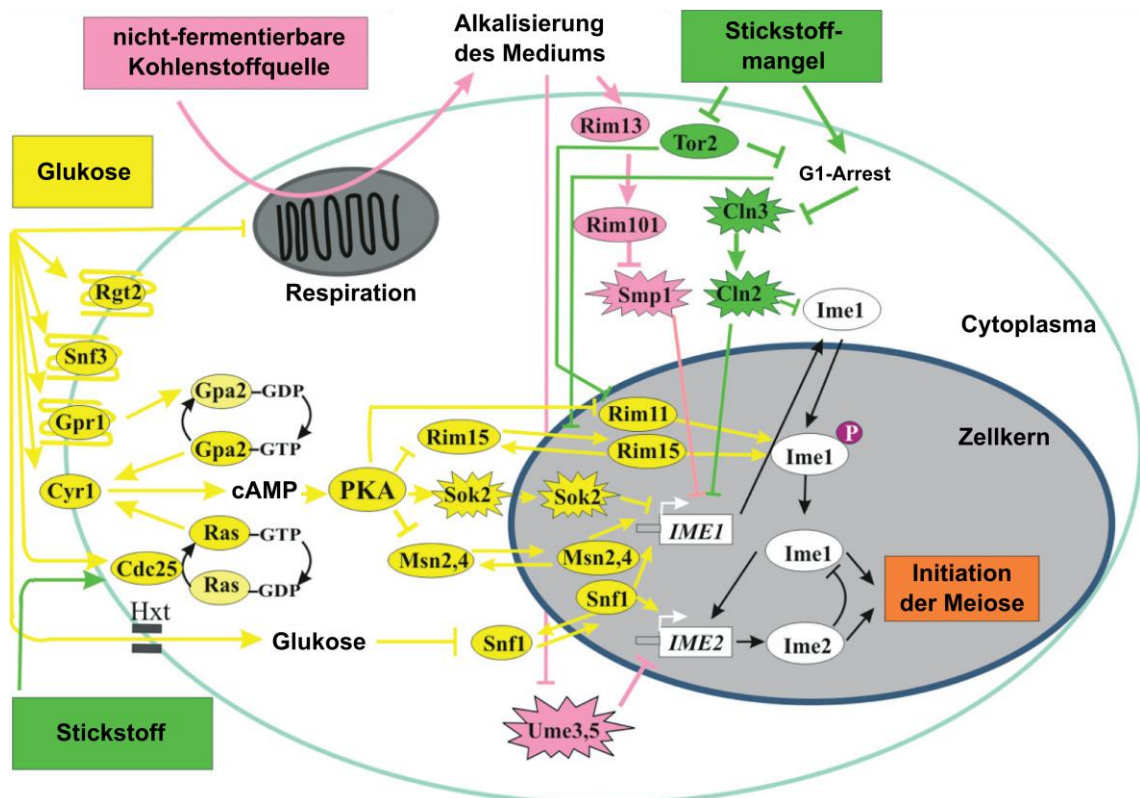
Initiation der Prosporenmembran-Bildung finden nicht an allen Spindelpolkörpern zur gleichen Zeit statt. Die Spindelpolkörper werden schrittweise aktiviert, bis die finale Anzahl aktivierter Spindelpolkörper erreicht ist. Dieser Prozess wird durch die Verfügbarkeit von MP-Proteinen limitiert (Taxis *et al.*, 2005). Alle vier Spindelpolkörper setzen sich aus den gleichen Komponenten zusammen (Bajgier *et al.*, 2001; Knop and Strasser, 2000; Nickas *et al.*, 2003), trotzdem wird die Bildung der meiotischen Platte abhängig von einem bisher unbekanntem Zellzyklussignal an jedem Spindelpolkörper einzeln initiiert. Ebenfalls unbekannt ist, was die molekularen Unterschiede zwischen den Spindelpolkörper ausmacht.

Die Prosporen sind von zwei aufeinander liegenden Membranen umgeben (Davidow *et al.*, 1980; Peterson *et al.*, 1972). Zum Ende der Sporenmorphogenese bildet sich zwischen diesen beiden Membranen eine vierschichtige Sporenwand. Die beiden inneren Schichten bestehen hauptsächlich aus Mannan und  $\beta$ -1,3-Glukan. Die dritte Schicht besteht aus Chitosan ( $\beta$ -1,4-verbundenes Glukosamin). Die äußere Schicht besteht zum großen Teil aus Dityrosin-Molekülen (Briza *et al.*, 1988; Briza *et al.*, 1986). Die Sporenmorphogenese ist mit der Bildung der Sporenwand abgeschlossen, die fertigen Sporen sind gegen eine Vielzahl von Umwelteinflüssen, zum Beispiel gegen Hitze oder die Anwesenheit von Glucanasen, resistent (Coluccio *et al.*, 2008; Smits *et al.*, 2001). Verbessern sich die Nahrungsbedingungen, keimen die Sporen aus, vermehren sich entweder als haploide oder nach Kreuzung mit dem passenden Kreuzungspartner als diploide Zellen.

### **1.2.2 Regulation des Eintritts in die Sporulation durch Signaltransduktionswege**

Wie bereits beschrieben ist die Initiation der Sporulation nur unter ganz bestimmten Nährstoffbedingungen möglich. Glukose und Stickstoff (oder ein anderer essentieller Nährstoff) dürfen nicht vorhanden sein, zusätzlich dazu muss eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung stehen. Wie alle Zellen muss die Hefezelle in der Lage sein, die Nährstoffbedingungen wahrzunehmen und spezifisch auf diese zu reagieren. Der Eintritt in die Meiose wird in *S. cerevisiae* von verschiedenen, miteinander vernetzten Signaltransduktionswegen reguliert, die letztlich die Expression, Stabilität und Aktivität von Ime1 regulieren. Ein Signaltransduktionsweg, der auf die in Folge der Respiration entstehende Alkalisierung des Mediums reagiert, ist der Rim101-Signaltransduktionsweg. Die Stickstoffverfügbarkeit wird durch den Tor2-,

Verfügbarkeit von Glukose durch den Glukose-Repressions-, den Rgt1- und den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg wahrgenommen (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Regulation des Eintritts in die Meiose durch Signaltransduktionswege**

Die Initiation der Meiose wird durch ein Netzwerk von Signaltransduktionswegen reguliert. Der Glukose-Repressionsweg, der Rim101-, der Tor2- und der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg regulieren den Eintritt in die Meiose durch Regulation der *IME1*-Expression. Glukose inhibiert den Eintritt in die Meiose durch Aktivierung des Repressors Sok2 und durch Inhibierung der Aktivatoren Msn2, Msn4 und Snf1. Darüber hinaus inhibiert Glukose die Respiration, die für die Alkalisierung des Mediums verantwortlich ist. Alkalisierung des Mediums inhibiert den Smp1-Repressor. Glukose und Stickstoff reprimieren die Kinasen Rim11 und Rim15, die durch Phosphorylierung die Aktivität von Ime1 regulieren. Der Mangel an essentiellen Nährstoffen führt zu einem G1-Arrest, dies ermöglicht die Expression von *IME1* und den Transport von Ime1 in den Zellkern. Expression von *IME1* führt zur Expression von *IME2*, dessen Genprodukt die frühen meiotischen Gene aktiviert und damit die Initiation der Meiose einleitet. Modifiziert nach Piekarska *et al.*, 2010.

### 1.2.2.1 Der Tor2-Signaltransduktionsweg

Stickstoff ist ein essentieller Nährstoff, dessen Mangel eine Bedingung ist, die zur Initiation der Sporulation führt. Ob eine verfügbare Stickstoffquelle die Initiation der Meiose direkt reprimiert oder Stickstoffmangel einen indirekten Einfluss, durch Hervorrufen des G1-Arrests ausübt, ist nicht klar. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Meiose auch in Anwesenheit von Stickstoff eingeleitet wird, wenn andere essentielle Nährstoffe fehlen (Freese *et al.*, 1982; Freese *et al.*, 1984).

In *S. cerevisiae* wird die Anwesenheit und Qualität einer Stickstoffquelle von den zwei Proteinkomplexen *target of rapamycin* Komplex 1 (TORC1) und *target of rapamycin* Komplex 2 (TORC2) wahrgenommen. Tor2 bildet mit anderen Proteinen den TOR2-

Komplex, der die Organisation des Aktinzytoskeletts und die Zellpolarität reguliert, während Tor1 oder Tor2 innerhalb des TOR1-Komplexes die Zellproliferation regulieren (De Virgilio and Loewith, 2006; Loewith *et al.*, 2002; Wullschleger *et al.*, 2006; Wullschleger *et al.*, 2005). Die beiden TOR-Komplexe regulieren eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse, wie die Translation, die Biosynthese von Ribosomen oder den Transport von Aminosäuren (Inoki *et al.*, 2005; Martin and Hall, 2005; Raught *et al.*, 2001). Der TOR1 kann im Gegensatz zum TOR2 durch das lipophile Makrolid Rapamycin inhibiert werden (Heitman *et al.*, 1991; Loewith *et al.*, 2002). Da die Inhibierung des TOR1 durch Rapamycin phänotypisch einer Stickstoff-Hungerung gleicht, geht man davon aus, dass die TOR-Komplexe zelluläre Prozesse in Abhängigkeit verfügbarer Stickstoffquellen regulieren (Hardwick *et al.*, 1999; Zaragoza *et al.*, 1998).

Eine Rolle bei der Regulation des Eintritts in die Meiose spielt Tor2. Bei guter Nährstoffversorgung während des vegetativen Wachstums sorgt Tor2 dafür, dass die Zelle die G1-Phase des Zellzyklus verlässt und in die S-Phase eintritt (Barbet *et al.*, 1996; Kunz *et al.*, 1993). Mangelbedingungen führen zu einer Inaktivierung von Tor2 und eine dadurch bedingte Blockierung der Translationsinitiation (Barbet *et al.*, 1996; Zinzalla *et al.*, 2007). Dies führt dazu, dass die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert. Der G1-Arrest führt zu einer drastischen Abnahme des G1-Zyklins Cln3 (Gallego *et al.*, 1997; Parviz and Heideman, 1998), das für den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus benötigt wird (Cross and Blake, 1993; Tyers *et al.*, 1992). Die Abnahme von Cln3 fördert den Eintritt in die Meiose, weil Cln3 die *IME1*-Expression und die Translokation von Ime1 in den Zellkern inhibiert (Colomina *et al.*, 1999). In der G1-Phase des Zellzyklus aktiviert Cln3 den Swi4-Swi6 Komplex, der für die Expression der G1-Zyklone *CLN1* und *CLN2* benötigt wird (Levine *et al.*, 1996). Da Cln2 und Swi6 die *IME1*-Expression reprimieren, fördert die Abnahme von Cln3 während des G1-Arrests den Eintritt in die Meiose auch indirekt (Purnapatre *et al.*, 2002).

#### 1.2.2.2 Der Rim101-Signaltransduktionsweg

Die Anwesenheit einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle, wie zum Beispiel Kaliumacetat, ist für den Eintritt in die Meiose essentiell. Die respiratorische Verstoffwechslung von Kaliumacetat führt zur Produktion von CO<sub>2</sub>, das sich im umgebenden Medium zum Teil löst und dann als Bicarbonation (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) vorliegt, was



zu einer Alkalisierung des Mediums führt (Hayashi *et al.*, 1998a). Diese trägt zur Initiation der Meiose bei (Ohkuni *et al.*, 1998). Weitere Alkalisierung des Mediums entsteht durch die Aufnahme von Acetat in Form von Essigsäure (Dickinson *et al.*, 1983; Mollapour and Piper, 2007). Durch die Umwandlung von Acetat in Essigsäure werden dem Medium  $H^+$ -Ionen entzogen, was einen Anstieg des alkalischen pH zur Folge hat. Die Erhöhung des pH-Wertes führt zu einer Aktivierung des Rim101-Signaltransduktionsweges. Der Transkriptionsfaktor Rim101 wird unter alkalischen Bedingungen durch die Rim13-Protease proteolytisch prozessiert und dadurch aktiviert (Lamb *et al.*, 2001). Aktiviertes Rim101 reprimiert Smp1, das die Expression von *IME1* reprimiert (Su and Mitchell, 1993). Ebenso führt die Alkalisierung des Mediums zur Aktivierung des Ume3-Ume5-Cyclin-Kinase-Komplexes (auch Srb11-Srb10- oder Ssn3-Ssn8-Komplex genannt), diese Aktivierung wird für die Induktion der *IME2*-Transkription benötigt (Cooper and Strich, 2002; Ohkuni and Yamashita, 2000).

### 1.2.2.3 Der Glukose-Repressions-Signaltransduktionsweg

In Anwesenheit von Glukose werden in *S. cerevisiae* und in anderen Pilzen Gene reprimiert, die für die Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen zuständig sind (Johnston and Carlson, 1992; Ronne, 1995). Die Repression dieser Gene in Anwesenheit von Glukose stellt sicher, dass Glukose als Kohlenstoffquelle präferiert verstoffwechselt wird. Die zentrale Komponente des Glukose-Repressions-Signaltransduktionsweges ist die Serin/Threonin-Kinase Snf1 (Celenza and Carlson, 1984). Snf1 kommt in einem heterotrimeren Komplex mit den Proteinen Snf4 (regulatorische Untereinheit), und entweder Gal83, Sip1 oder Sip2 (Beta-Untereinheiten) vor (Celenza *et al.*, 1989; Jiang and Carlson, 1997). Unter glukosereichen Bedingungen ist Snf1 inaktiv. Fehlt Glukose, wird Snf1 von den Kinasen Pak1, Tos3 und Elm1 phosphoryliert und damit aktiviert (Hong *et al.*, 2003; McCartney and Schmidt, 2001; Wilson *et al.*, 1996). Aktives Snf1 phosphoryliert die Transkriptionsaktivatoren Cat8 und Sip4, die die Expression von Genen aktivieren, die für die Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen zuständig sind. Dies geschieht durch Bindung an sogenannte *carbon source responsive elements* (CSREs) in den Promotoren dieser Gene (Randez-Gil *et al.*, 1997; Vincent and Carlson, 1998). Zusätzlich dazu inaktiviert Snf1 durch Phosphorylierung den transkriptionellen Repressor Mig1, der unter glukosereichen Bedingungen die Expression von Genen reprimiert, die für die Verstoffwechslung alternativer Kohlenstoffquellen verantwortlich sind (Carlson, 1999; Schuller, 2003; Vallier and Carlson, 1994).

Für die Initiation der Meiose ist Snf1 wichtig, da die Transkription von *IME1* und *IME2* nur in Anwesenheit von aktivem Snf1 stattfindet (Honigberg and Lee, 1998).

#### 1.2.2.4 Der Rgt1-Signaltransduktionsweg

Der Rgt1-Signaltransduktionsweg beruht auf der Regulation des Rgt1-Repressors durch die Glukose Sensoren Snf3 und Rgt2. Rgt1 ist ein bifunktionaler Transkriptionsfaktor, der die Expression sogenannter *HXT*-Gene reguliert, die für Hexose-Transporter kodieren. *S. cerevisiae* kodiert für eine Vielzahl an Hexose-Transportern (Hxt1-17, Gal2, Snf3, Rgt2), die alle unterschiedliche Substrataffinitäten und Expressionsmuster aufweisen (Bisson *et al.*, 1993; Boles and Hollenberg, 1997; Kruckeberg, 1996). Je nachdem wie viel Glukose zur Verfügung steht, werden unterschiedliche Transporter exprimiert. Welche Transporter exprimiert werden, wird durch den Rgt1-Signaltransduktionsweg reguliert. Snf3 und Rgt1 spielen für die Initiation der Meiose eine Rolle, da sie die Stabilität von Ime2 regulieren (Gray *et al.*, 2008).

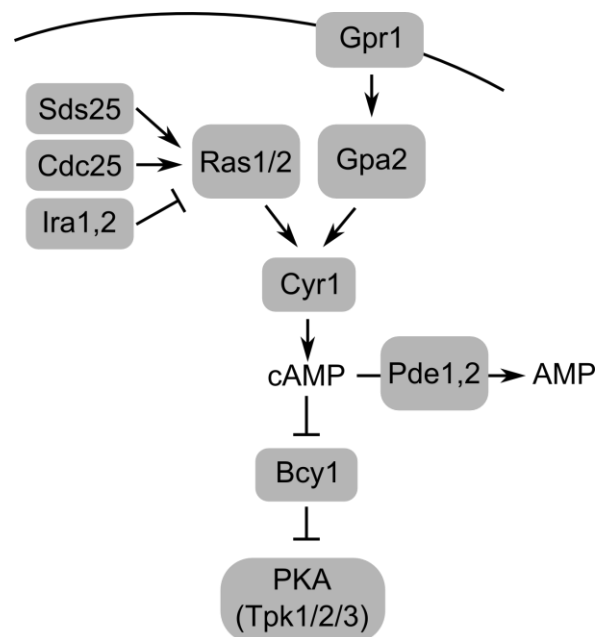
#### 1.2.2.5 Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg

Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg spielt in *S. cerevisiae* eine große Rolle bei der Kontrolle des Metabolismus, der Stressresistenz, Proliferation und Sporulation. Die Aktivität des Signaltransduktionsweges wird durch die Nährstoffsituation reguliert (Thevelein and de Winde, 1999; Thevelein *et al.*, 2005). In hungernden Zellen werden große Mengen an Speicherkohlenhydraten wie Trehalose und Glykogen angesammelt und es werden Gene exprimiert, die für die Stressresistenz wichtig sind, also beim Überdauern des Hungerzustandes eine Rolle spielen. Es findet also eine Anpassung des Stoffwechsels an die Hungerbedingungen statt. Zellen, denen genügend Nährstoffe zur Verfügung stehen, zeigen den entgegengesetzten Phänotyp (Gray *et al.*, 2004; Schneper *et al.*, 2004). Wenn Stickstoffmangel herrscht, aber eine fermentierbare Kohlenstoffquelle vorhanden ist, leiten Hefezellen das pseudohyphale Wachstum ein (Pan *et al.*, 2000). Zu einem großen Teil werden die beschriebenen Änderungen im Stoffwechsel und in der Zellmorphologie durch die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges reguliert (Abbildung 4).

Besonders gut untersucht ist die Regulation des Signaltransduktionsweges durch Glukose. Der zentrale Bestandteil des Signaltransduktionsweges ist die Adenylylzyklase Cyr1, ein Enzym, das die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert (Kataoka *et al.*, 1985). Der Abbau von cAMP findet durch die beiden

Phosphodiesterasen Pde1 und Pde2 statt (Nikawa *et al.*, 1987; Sass *et al.*, 1986). Das *second messenger*-Molekül cAMP übt einen inhibitorischen Einfluss auf Bcy1, die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) aus. Bcy1 inhibiert PKA durch Bildung eines inaktiven heterotrimeren Komplexes mit den katalytischen Untereinheiten der PKA, Tpk1, Tpk2 und Tpk3 (Toda *et al.*, 1987b). Dabei binden zwei regulatorische Untereinheiten zwei katalytische Untereinheiten. In Anwesenheit von cAMP bindet dieses an Bcy1, was zur Folge hat, dass Bcy1 als Homodimer aus dem Komplex dissoziiert und dadurch die PKA aktiviert wird. Unter anderem wird auch Bcy1 selber von PKA phosphoryliert; Studien haben gezeigt, dass dadurch die Bindeaffinität von Bcy1 reguliert wird (Kuret *et al.*, 1988). Weiterhin wird Bcy1 abhängig von externen Stimuli durch andere Kinasen wie Yak1 und Mck1 phosphoryliert, dies hat einen Einfluss auf die Kernlokalisierung von Bcy1 (Griffioen *et al.*, 2001; Werner-Washburne *et al.*, 1991). Die phosphorylierte Form von Bcy1 verändert ihre Lokalisation vom Kern in das Cytoplasma durch Interaktion mit Zds1, man geht davon aus, dass der Ausschluss von Bcy1 aus dem Zellkern eine Möglichkeit ist, die PKA-Aktivität zu regulieren (Griffioen *et al.*, 2001; Griffioen *et al.*, 2003). Die Adenylylzyklase Cyr1 wird abhängig von Glukose durch das G-Protein Gpa2 und die kleinen GTPasen Ras1 und Ras2 aktiviert. Man geht davon aus, dass Gpa2 bei der Aktivierung von Cyr1 durch extrazellulär vorhandene Glukose eine Rolle spielt, während die beiden Ras-Proteine Cyr1 abhängig von intrazellulär vorhandener Glukose aktivieren.

Extrazellulär vorhandene Glucose wird durch den Plasmamembran gebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor Gpr1 erkannt (Lorenz *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2000). Gpr1 interagiert physikalisch mit dem kleinen GTP-bindenden G-Protein Gpa2, das die  $G_{\alpha}$ -Untereinheit des G-Protein-gekoppelten Rezeptorsystems ist. Diese Interaktion stimuliert in Gpa2 den Austausch von GDP zu GTP (Kraakman *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 1998). GTP-gebundenes Gpa2 aktiviert den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg durch Aktivierung der cAMP-Synthese von Cyr1 (Colombo *et al.*, 1998; Kubler *et al.*, 1997; Lorenz and Heitman, 1997; Nakafuku *et al.*, 1988; Rolland *et al.*, 2000). Die intrinsische GTPase Aktivität von Gpa2 wird auch durch das Protein Rgs2 aktiviert (Versele *et al.*, 1999). Es ist nicht geklärt, ob Gpa2, wie andere  $G_{\alpha}$ -Proteine auch mit  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten interagiert (Hoffman, 2005; Versele *et al.*, 2001). Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass das Protein Asc1 die  $G_{\beta}$ -Untereinheit für Gpa2 ist. Dafür spricht, dass Asc1 direkt mit Gpa2 interagiert und dessen Aktivität reguliert.



#### Abbildung 4: Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg

Die Adenylylzyklase Cyr1 wird abhängig von intrazellulär vorhandener Glukose von den Proteinen Ras1 und Ras2 aktiviert. Die Aktivität von Ras1 und Ras2 wird durch Cdc25 und Sds25 positiv und durch Ira1 und Ira2 negativ reguliert. Eine Aktivierung in Abhängigkeit extrazellulär vorhandener Glukose findet durch das Gpr1-Gpa2-Rezeptorsystem statt. Aktiviertes Cyr1 katalysiert die Synthese des *second messenger* Moleküls cAMP aus ATP. Der Abbau von cAMP zu AMP wird durch die Phosphodiesterasen Pde1 und Pde2 katalysiert. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A, Bcy1, die daraufhin aus dem PKA-Komplex dissoziiert. Dies führt zur Aktivierung der katalytischen PKA-Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3, und zur Regulation von Zielproteinen durch Phosphorylierung. Alternative Aktivierungsmöglichkeiten des cAMP/PKA-Signalweges werden im Text beschrieben.

Weiterhin ähnelt Asc1 auch strukturell anderen bekannten  $G_{\beta}$ -Untereinheiten (Zeller *et al.*, 2007). Andere Studien gehen davon aus, dass die Kelch-Proteine Krh1/Gpb2 und Krh2/Gpb1 die  $G_{\beta}$ -Untereinheiten und Gpg1 die  $G_{\gamma}$ -Untereinheit für Gpa2 darstellen (Batlle *et al.*, 2003; Harashima and Heitman, 2002; Peeters *et al.*, 2006).

Die Aktivierung von Cyr1 in Abhängigkeit intrazellulär vorhandener Glukose findet höchstwahrscheinlich durch Ras1 und Ras2 statt. Die kleinen GTPasen sind in GTP-gebundener Form aktiv und in GDP-gebundener Form inaktiv (Broach, 1991). Die GTP- und GDP-Beladung wird durch sogenannte Guanosin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEF; *guanosine nucleotide exchange factor*) und GTPase-aktivierende Proteine (GAP; *GTPase activating protein*) reguliert. Die GEFs Cdc25 und Sdc25 aktivieren Ras1 und Ras2 durch Stimulierung des Austausches von GDP durch GTP (Boy-Marcotte *et al.*, 1996; Broek *et al.*, 1987; Crechet *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1991). Die GAPs Ira1 und Ira2 inaktivieren Ras1 und Ras2 hingegen durch Aktivierung ihrer intrinsischen GTPase-Aktivität, dies führt zur Hydrolyse von GTP zu GDP (Tanaka *et al.*, 1989; Tanaka *et al.*, 1990). Weiterhin ist bekannt, dass Ira1 die Lokalisation von Cyr1 reguliert (Mitts *et al.*, 1991).

Neben der cAMP abhängigen Aktivierung der PKA in Anwesenheit von Glukose sind noch alternative Möglichkeiten der Aktivierung bekannt. Auch andere essentielle Nährstoffe wie Stickstoff, Ammonium, Schwefel und Phosphat oder bestimmte Aminosäuren üben ähnliche Effekte auf PKA-Zielproteine aus, wie sie bei der cAMP-abhängigen Aktivierung von PKA beobachtet werden (Donaton *et al.*, 2003; Giots *et al.*, 2003; Lundh *et al.*, 2009; Van Nuland *et al.*, 2006). Die von diesen Nährstoffen abhängige Aktivierung von PKA-Zielen findet nur in Anwesenheit von Glukose statt, ist unabhängig von cAMP, benötigt aber die katalytischen Untereinheiten der PKA. Weiterhin konnte eine Aktivierung von PKA-Zielen durch die genannten Nährstoffe nur dann beobachtet werden, wenn der jeweilige Nährstoff zu gehungerten Zellen resupplementiert wurde. Diese cAMP-unabhängige Aktivierung der PKA könnte durch zwei Mechanismen erfolgen. Der Signaltransduktionsweg, der für die cAMP-unabhängige Aktivierung von PKA-Zielen verantwortlich ist, ist der FGM-Signaltransduktionsweg (*fermentable growth medium induced*; (Thevelein, 1991, 1994). Die PKA-Ziele werden im FGM-Signaltransduktionsweg durch die Kinase Sch9 kontrolliert (Crauwels *et al.*, 1997), die funktionell und strukturell den katalytischen Untereinheiten der PKA ähnelt und teilweise redundante Funktionen besitzt (Toda *et al.*, 1988). Des Weiteren ist bekannt, dass die Kelch-Proteine Krh1 und Krh2 die PKA-Aktivität unabhängig von Cyr1 durch Bindung an PKA beeinflussen (Peeters *et al.*, 2006). Auch eine Aktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges durch intrazelluläre Azidifizierung wurde beschrieben (Dechant *et al.*, 2010; Thevelein, 1991). Des Weiteren ist bekannt, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg in anderen Pilzen, wie *Candida albicans* oder *Cryptococcus neoformans*, sowie in Cyanobakterien und menschlichen Zellen durch Bicarbonat beeinflusst wird. Es gibt mehrere Klassen von Adenylylzyklasen. Studien haben gezeigt, dass viele Adenylylzyklasen der Klasse III, zu denen auch Cyr1 aus *S. cerevisiae* gehört<sup>1</sup>, direkt durch Bicarbonat aktiviert werden (Bahn *et al.*, 2005; Cann *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2010; Klengel *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass diese Adenylylzyklasen evolutionär konservierte CO<sub>2</sub>- und Bicarbonatsensoren sind (Chen *et al.*, 2000). Für die Adenylylzyklase Cya1 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 konnte hingegen gezeigt werden, dass sie durch Bicarbonat inaktiviert wird (Masuda and Ono, 2005). Bisher ist nicht geklärt, ob die Adenylylzyklase Cyr1 aus *S. cerevisiae* in ihrer Aktivität durch Bicarbonat beeinflusst wird.

---

<sup>1</sup> <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR001054>

Die aktivierte Proteinkinase A reguliert eine Vielzahl von Zielproteinen durch Phosphorylierung. Tpk1 erkennt 256, Tpk2 29 und Tpk3 79 Substrate. Nur 8 Substrate werden von allen drei Untereinheiten erkannt, was für eine hohe Substratspezifität spricht. Die durch PKA regulierten Zielproteine sind unter anderem an der Regulation des Wachstums, der Stressresistenz, des Kohlenstoffmetabolismus oder der Meiose beteiligt (Ptacek *et al.*, 2005; Ptacek and Snyder, 2006).

Gut untersucht ist die PKA-abhängige Regulation der Transkriptionsfaktoren Msn2 und Msn4, die an der Ausbildung der Stressresistenz beteiligt sind (Martinez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt and McEntee, 1996). Msn2 und Msn4 regulieren etwa 200 Gene, die bei diversen Stressbedingungen wie Hitzeschock, oxidativem Stress, osmotischem Stress oder Glukosemangel benötigt werden (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000). Msn2 und Msn4 besitzen eine konservierte Kernlokalisationssequenz, die durch Phosphorylierung von PKA negativ kontrolliert wird. Unter normalen Bedingungen wird die Kernlokalisationssequenz von PKA phosphoryliert, dies führt zur Lokalisation von Msn2 und Msn4 im Cytoplasma. Unter Glukose-Mangelbedingungen nimmt die PKA-Aktivität und damit die Phosphorylierung der Kernlokalisationssequenz von Msn2 und Msn4 ab (Gorner *et al.*, 1998; Gorner *et al.*, 2002). Dies führt zur Lokalisation von Msn2 und Msn4 im Zellkern der Zelle, wo sie die Expression von Genen regulieren, die in ihren Promotoren sogenannte Stresselemente (STREs) besitzen (Causton *et al.*, 2001; Gasch *et al.*, 2000; Martinez-Pastor *et al.*, 1996). Neben der Phosphorylierung der Kernlokalisationssequenz durch PKA, gibt es noch weitere Mechanismen, die die Lokalisation der Transkriptionsfaktoren regulieren. Zum Einen überwiegt während des normalen Wachstums der nukleäre Export dem Import von Msn2. Die Deletion von *MSN5*, das für ein Exportin kodiert, führt zur Akkumulation von Msn2 im Zellkern (Alepuz *et al.*, 1999; Gorner *et al.*, 2002). Zum Anderen werden Msn2 und Msn4 durch das Protein Bmh2 im Cytoplasma gehalten (Beck and Hall, 1999). Des Weiteren ist bekannt dass Msn2 und Msn4 ein oszillatorisches Verhalten zeigen und periodisch aus dem Zellkern heraus und wieder herein transportiert werden. In Abwesenheit von PKA behält Msn4 dieses Verhalten bei, während Msn2 vorwiegend im Zellkern lokalisiert und die Lokalisation nicht mehr periodisch zwischen Zellkern und Cytoplasma wechselt (Jacquet *et al.*, 2003).

Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Eintritts in die Meiose (Matsumoto *et al.*, 1982). Die Aktivierung der PKA hat eine Reprimierung der *IME1*-Expression zur Folge (Matsuura *et al.*, 1990). PKA-Aktivität

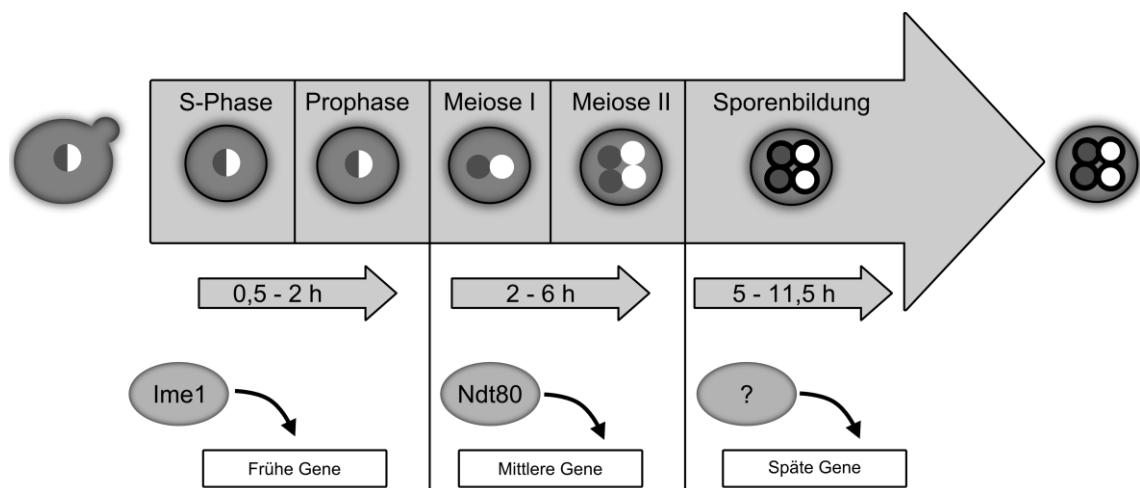
beeinflusst neben der nukleocytoplasmatischen Lokalisation von Msn2 und Msn4 auch ihre Funktion als transkriptionelle Aktivatoren (Garreau *et al.*, 2000). So wird verhindert, dass Msn2 und Msn4 die Expression von Genen aktivieren, die für die Initiation der Meiose benötigt werden (Honigberg and Purnapatre, 2003). Zu diesen Genen gehört zum Beispiel *TPS1*, dessen Genprodukt für die Induktion der *IME1*-Expression benötigt wird (De Silva-Udawatta and Cannon, 2001). Hinzukommt, dass Msn2 und Msn4 auch direkt die Expression von *IME1* induzieren (Sagee *et al.*, 1998). Das nukleäre Protein Sok2 reguliert die Mitose positiv und die Meiose negativ, und wird seinerseits von PKA reguliert. Man nimmt an, dass Sok2 an den Msn2-Msn4-Komplex bindet, der dadurch in einen transkriptionellen Repressor konvertiert wird (Shenhar and Kassir, 2001). Eine weitere Regulationsmöglichkeit findet über die Kinasen Rim11 und Rim15 statt, die die Aktivität von Ime1 durch Phosphorylierung erhöhen und damit die Induktion der Meiose fördern (Rubin-Bejerano *et al.*, 2004; Zaman *et al.*, 2008). Rim11 und Rim15 phosphorylieren auch Ume6 und fördern damit die Bildung des Ime1-Ume6 Komplexes, der unter anderem die Transkription von *IME2* und *MPC54* induziert (Malathi *et al.*, 1997; Vidan and Mitchell, 1997). PKA-Aktivität inhibiert sowohl Rim11, als auch Rim15. Diese Regulationsmechanismen stellen sicher, dass die Meiose nur in Abwesenheit von Glukose initiiert wird.

Neben der Initiation der Meiose beeinflusst der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg auch den Hap2/3/4/5-Komplex. Dieser ist ein transkriptioneller Aktivator und reguliert die Transkription von Genen, die für das respiratorische Wachstum wichtig sind (McNabb *et al.*, 1995; Olesen and Guarente, 1990; Pinkham and Guarente, 1985). Der Hap2/3/4/5-Komplex reguliert die Transkription von *MPC70* (Lee *et al.*, 2002). Damit beeinflusst der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg die Expression von *MPC70* indirekt. Weiterhin ist bekannt, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg auch eine Rolle bei der Morphogenese der Sporen spielt, da er die MAP-Kinase Smk1, die für die Bildung der Sporenwand benötigt wird, reguliert (McDonald *et al.*, 2009). In der Studie von McDonald *et al.* wurde nach Mutanten gesucht, die den temperatursensitiven Phänotyp einer *smk1-2*-Mutante supprimieren. Die *smk1-2*-Mutante führt nur einen Teil der zur Sporenmorphogenese nötigen Schritte durch (Wagner *et al.*, 1999). Die Suche nach Suppressoren dieses Phänotyps ergab, dass nicht vollständig funktionale Allele von *CDC25* und *CYR1*, deren Expression zu einer geringen PKA-Aktivität führt, den temperatursensitiven Phänotyp der *smk1-2*-Mutante supprimieren. Die Autoren schlussfolgern, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg Smk1 negativ reguliert.

Ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges an der Regulation von späten meiotischen Prozessen, wie der Bildung der Sporen, ist, dass eine temperatursensitive *cyr1*-Mutante unter restriktiven Bedingungen überwiegend Asci mit zwei Sporen produziert (Matsumoto *et al.*, 1983).

### 1.2.3 Transkriptionelle Regulation der Sporulation

Der Ablauf der Sporulation wird durch eine streng hierarchisch ablaufende Genexpressionskaskade kontrolliert. Microarray-Analysen haben gezeigt, dass mehr als 1000 Gene während der Sporulation spezifisch transkriptionell reguliert werden. Etwa die Hälfte dieser Gene wird während verschiedener Stadien der Meiose hochreguliert, die andere Hälfte reprimiert (Chu *et al.*, 1998; Primig *et al.*, 2000). Je nach Zeitpunkt ihrer Aktivierung während der Sporulation wird zwischen frühen, mittleren und späten meiotischen Genen unterschieden (Mitchell, 1994; Abbildung 5).



**Abbildung 5: Transkriptionelle Regulation der Meiose**

Während der Meiose werden drei generelle Klassen von Genen exprimiert. Je nach Zeitpunkt ihrer Expression unterscheidet man zwischen frühen, mittleren und späten Genen. Frühe Gene werden durch den Transkriptionsfaktor Ime1 reguliert, mittlere Gene durch Ndt80. Der Transkriptionsfaktor, der die Expression später Gene reguliert, ist nicht bekannt. Die Zeitskala bezieht sich auf die Sporulation von Hefestämmen mit dem genetischen SK1-Hintergrund. Modifiziert nach Piekarska *et al.*, 2010.

Genprodukte der frühen Gene sind vor allem für Prozesse während der meiotischen Prophase zuständig, wie DNA-Replikation und Rekombination. Die der mittleren Gene sind hauptsächlich für die beiden meiotischen Teilungen nötig, während die der späten Gene an der Sporenmorphogenese beteiligt sind. Die Mitglieder der einzelnen Klassen von Genen besitzen in ihren Promotoren gemeinsame regulatorische Sequenzen, die von Transkriptionsfaktoren gebunden werden, die für die zeitliche Regulation der entsprechenden Gene zuständig sind. Frühe Gene werden vom Transkriptionsfaktor Ime1, im Komplex mit Ume6 aktiviert (Granot *et al.*, 1989; Kassir *et al.*, 1988;



Matsuura *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990), mittlere Gene von Ndt80 (Chu and Herskowitz, 1998; Pak and Segall, 2002a, b; Pierce *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 1995), der Aktivator für späte meiotische Gene ist bisher nicht bekannt.

Während des vegetativen Wachstums werden frühe meiotische Gene durch Bindung von Ume6 an *URSI*-Sequenzen (*upstream repression sequence*) innerhalb ihrer Promotoren reprimiert (Anderson *et al.*, 1995; Steber and Esposito, 1995; Strich *et al.*, 1994). Ume6 rekrutiert zwei weitere Co-Repressorkomplexe, einer besteht aus Sin3 und Rpd3 (Kadosh and Struhl, 1998), der andere enthält Isw2, eine Untereinheit eines Chromatin-Remodelling-Komplexes (Fazzio *et al.*, 2001; Goldmark *et al.*, 2000).

Die Expression der mittleren meiotischen Gene wird durch Bindung von Sum1 an MSE-Sequenzen (*middle sporulation element*) reprimiert (Xie *et al.*, 1999). Sum1 rekrutiert in einer Rmf1-abhängigen Weise (McCord *et al.*, 2003), die Histondeacetylase Hst1 (Weber *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 1999).

Über die Repression später Gene ist weniger bekannt, der Ssn6-Tup1-Komplex scheint dabei aber eine wichtige Rolle zu spielen (Friesen *et al.*, 1997; Mizuno *et al.*, 1998; Zhang and Reese, 2004). In haploiden Zellen verhindert Rme1 durch Bindung an UCS4-Elemente im *IME1*-Promotor die Expression von *IME1* (Mitchell and Herskowitz, 1986).

Die Sporulation wird durch die Expression und Aktivierung von Ime1 initiiert. Ime1 ist ein wichtiges regulatorisches Protein, das die Initiation der Meiose reguliert (Kassir *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1990). Es wird sowohl transkriptionell, als auch postranskriptionell reguliert. Der *IME1*-Promotor ist mit 2,1 kb sehr groß und enthält mehrere regulatorische Sequenzen (Sagee *et al.*, 1998). Eine volle Aktivierung der *IME1*-Expression findet nur dann statt, wenn die Zelle diploid, Glukose und Stickstoff abwesend und eine nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle vorhanden ist (Clancy *et al.*, 2002; Covitz *et al.*, 1991; Kassir *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 1982; Matsuura *et al.*, 1990; Sagee *et al.*, 1998; Shah and Clancy, 1992). Ime1 aktiviert die Expression einer Reihe von frühen Genen unter anderem auch die von *IME2*, das für eine Ser/Thr-Proteinkinase kodiert. Ime2 ist neben Ime1 das zweite wichtige, regulatorische Protein, das für die Initiation der Meiose essentiell ist (Mitchell, 1994). Ime2 kontrolliert unter anderem die Transition von der G1-Phase des mitotischen Zellzyklus in die S-Phase des meiotischen Zellzyklus, indem es die Reduzierung der Menge an Sic1, einem Inhibitor der Clb-Cdc28-Kinase induziert (Benjamin *et al.*, 2003). Die Degradation von

Sic1 führt zur Aktivierung des Cdc28-Clb5/6-Komplexes, der die G1-S-Transition begünstigt (Kassir *et al.*, 2003; Mitchell, 1994; Vershon and Pierce, 2000). Im weiteren Verlauf der Meiose fördert Ime2 die Transition von der S- in die M-Phase durch Phosphorylierung und Aktivierung von Ndt80, dem Transkriptionsfaktor mittlerer meiotischer Gene (Benjamin *et al.*, 2003; Sopko *et al.*, 2002). Weiterhin übt Ime2 durch Phosphorylierung einen negativen Einfluss auf die Aktivität des transkriptionellen Repressors Sum1 aus (Shin *et al.*, 2010). Ebenfalls beeinflusst Ime2 die Segregation der Chromosomen (Benjamin *et al.*, 2003; Bolte *et al.*, 2002). Nach der zweiten meiotischen Teilung stoppt Ime2 die Expression der frühen meiotischen Gene, indem es Ime1 phosphoryliert und damit der Degradation zuführt (Guttmann-Raviv *et al.*, 2002). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Ime2 auch beim letzten Abschnitt der Sporulation, der Sporenmorphogenese eine Rolle spielt. Ime2 übt einen positiven Einfluss auf die Aktivität von Smk1 aus, einer MAP-Kinase, die für die Bildung der Sporenwand benötigt wird (Huang *et al.*, 2005; Krisak *et al.*, 1994).

Die Expression der mittleren meiotischen Gene, die für die Prophase I-Metaphase I-Transition wichtig sind, werden durch den Transkriptionsfaktor Ndt80 kontrolliert, der auch seine eigene Expression positiv beeinflusst (Chu and Herskowitz, 1998; Pak and Segall, 2002a, b; Pierce *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 1995). Ndt80 bindet an Gene, die MSE-Sequenzen (*middle sporulation element*) besitzen (Chu *et al.*, 1998; Vershon and Pierce, 2000).

Die späten meiotischen Gene werden je nach Zeitpunkt ihrer Aktivierung in mittelspäte und späte Gene eingeteilt (Chu *et al.*, 1998; Vershon and Pierce, 2000). Zu den mittelspäten Genen gehören vor allem solche, die an der Bildung der Sporen, während die späten Gene an ihrer Reifung beteiligt sind (Kassir *et al.*, 2003; Mitchell, 1994). Ein klassisches mittel bis spätes Gen ist *SPS1*, es kodiert für eine Serin/Threonin Kinase, die für die korrekte Lokalisation von Enzymen, die an der Synthese der Sporenwand beteiligt sind, wichtig ist (Friesen *et al.*, 1994; Iwamoto *et al.*, 2005).

Durch die transkriptionelle, kaskadenartige Kontrolle der Sporulation wird sichergestellt, dass alle nötigen Gene zum richtigen Zeitpunkt exprimiert werden. Die Repression von Ime1 während des vegetativen Wachstums und in haploiden Zellen sorgt dafür, dass nur diploide Zellen unter bestimmten Mangelbedingungen die Sporulation initiieren.

#### 1.2.4 Acetat-Stoffwechsel während der Sporulation

Acetat gelangt über einen Protonen-Symport-Mechanismus in die Zelle (Casal *et al.*, 1996; Makuc *et al.*, 2001). Der zuständige Transporter konnte bisher nicht identifiziert werden, ein Kandidat könnte das Protein Ady2 sein. Die Deletion von *ADY2* führt zu einem Verlust des aktiven Acetattransports (Paiva *et al.*, 2004). Weiterhin kann Acetat ( $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) in Form von Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) über das Aquaglyceroporin Fps1 durch passive Diffusion in die Zelle gelangen (Dickinson *et al.*, 1983; Mollapour and Piper, 2007).

Wenn Kaliumacetat während der Sporulation die einzige zur Verfügung stehende Kohlenstoffquelle ist, wird es sowohl für den katabolen, als auch für den anabolen Stoffwechsel genutzt (Esposito *et al.*, 1969). In beiden Fällen wird Acetat zunächst zu Acetyl-CoA umgewandelt. Der anabolische Stoffwechsel nutzt Acetyl-CoA zur Produktion von Glukose. Dabei wird Acetyl-CoA in den Glyoxylatzyklus eingespeist, der einige Enzyme mit dem Citratzyklus teilt (Lorenz and Fink, 2001). Der Glyoxylatzyklus nutzt im Gegensatz zum Citratzyklus zwei Moleküle Acetyl-CoA und resultiert in der Bildung von Succinat (Kornberg, 1966). Durch den Glyoxylatzyklus gebildetes Succinat wird in die Mitochondrien transferiert um den Citratzyklus mit  $\text{C}_4$ -Intermediaten zu versorgen (van Roermund *et al.*, 1995). Da die Membran der Mitochondrien impermeabel für Acetyl-CoA ist, gibt es neben dem Glyoxylatzyklus noch eine weitere Möglichkeit den Citratzyklus mit Kohlenstoffeinheiten zu versorgen. Ein spezielles Transportsystem für Fettsäuren ist das sogenannte *carnitine shuttle*. Die Grundlage dieses Transportsystems ist die Interaktion von Acetyl-CoA mit Carnitin. Diese Interaktion führt zur Bildung von Acetylcarnitin, das in die Mitochondrien transportiert wird, wo die Acetylgruppe zur Bildung von Acetyl-CoA wieder abgespalten wird. Acetyl-CoA wird dann in den Citratzyklus eingespeist (Bremer, 1983; Strijbis and Distel, 2010). Ebenfalls entsteht im Glyoxylatzyklus Oxaloacetat, das zur Neubildung von Glukose durch die Glukoneogenese genutzt wird. Für den katabolischen Stoffwechsel wird der Acetylrest des Acetyl-CoA durch den Citratzyklus schrittweise zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  abgebaut. Die dabei gewonnenen Elektronen werden zum Zwecke der ATP-Produktion der mitochondrialen Atmungskette zugeführt. Obwohl Acetat zur Energiegewinnung benötigt wird, ist das Hauptprodukt, das aus Acetat gewonnen wird, das Speicherkohlenhydrat Trehalose (Dickinson *et al.*, 1983). Für die

Meiose scheinen die Zellen aus dem vegetativen Wachstum demnach genügend Energiereserven mitzubringen.

### 1.2.5 Regulation der Sporenzahl

Die Anzahl an Sporen die in einer Zelle gebildet werden ist variabel. Unter guten Nährstoffbedingungen werden hauptsächlich Asci mit drei (Triaden) oder vier Sporen (Tetraden) gebildet. Steht nicht genügend Nahrung in Form von Kaliumacetat zur Verfügung, reduziert sich die Anzahl der Sporen auf zwei (Dyaden) oder eine Spore pro Zelle (Monaden). Ebenso nimmt unter schlechten Nahrungsbedingungen die Zahl der unsporulierten Zellen und Zellen, die zwar meiotische Teilungen durchgeführt, aber keine Sporen gebildet haben, zu. Diese Abhängigkeit der Sporenzahl von der Acetatverfügbarkeit wird Sporenzahlkontrolle genannt (Taxis *et al.*, 2005).

Es ist bekannt, dass die Menge an MP-Proteinen einen Einfluss auf die Zahl der gebildeten Sporen hat (Bajgier *et al.*, 2001; Nickas *et al.*, 2003; Taxis *et al.*, 2005; Wesp *et al.*, 2001). Unter guten Nahrungsbedingungen werden genügend meiotische Platte Proteine gebildet, so dass alle vier Spindelpolkörper mit einer meiotischen Platte modifiziert werden und durch Bildung der Prosporenmembran an jedem Spindelpolkörper vier Sporen entstehen. Steht nicht genügend Nahrung zur Verfügung, wird die MP-Proteinmenge reduziert, so dass nicht mehr alle vier Spindelpolkörper mit einer meiotischen Platte modifiziert werden können. Dementsprechend bildet sich auch die Prosporenmembran nur an ein oder zwei Spindelpolkörpern, was zur Bildung von Monaden beziehungsweise Dyaden führt (Taxis *et al.*, 2005). Die Menge an verfügbarer Nahrung hat also einen direkten Einfluss auf die MP-Proteinmenge und damit auf die Zahl der gebildeten Sporen. Unter Laborbedingungen wird das Nahrungsangebot ausschließlich durch die Menge an Kaliumacetat im Sporulationsmedium bestimmt.

Die Sporenzahlkontrolle bietet zwei wichtige Vorteile für die Population der Hefezellen. Erstens wird durch eine Anpassung der Sporenzahl an die Nährstoffsituation gewährleistet, dass innerhalb der Population eine maximale Anzahl lebensfähiger Sporen gebildet wird. Der zweite Vorteil ist, dass die beiden Sporen in einer Dyade fast ausschließlich nicht-Schwesterchromatiden enthalten. Dies ist dadurch begründet, dass bei der Bildung einer Dyade die beiden neueren Spindelpolkörper, die kurz vor der ersten meiotischen Teilung gebildet wurden, präferiert mit einer meiotischen Platte modifiziert werden (Gordon *et al.*, 2006; Nickas *et al.*, 2004; Taxis *et al.*, 2005). Zu den

neueren Spindelpolkörpern segregieren in der zweiten meiotischen Teilung immer die homologen nicht-Schwesterchromatiden. Dies gewährleistet unter schlechten Nährstoffbedingungen den Erhalt der genetischen Heterogenität innerhalb der Population. Es kommt oft vor, dass haploide Sporen eines Ascus bei Verbesserung der Nahrungssituation miteinander fusionieren (sog. *intra*-Ascus-Kreuzung). Im Fall einer Dyade werden durch die Sporenzahlkontrolle haploid letale Mutationen verdeckt, da jede der beiden Sporen DNA von unterschiedlichen, homologen Chromosomen enthält (Taxis *et al.*, 2005).

Wie genau die Nährstoffverfügbarkeit die Menge an MP-Proteinen oder die Unterschiede zwischen den Spindelpolkörpern beeinflusst, ist bisher nicht untersucht worden. Es sind mehrere Proteine bekannt, die die Sporenzahlkontrolle beeinflussen. Das Protein Ady1 (*accumulation of dyads 1*) ist an der Bildung der meiotischen Platte beteiligt (Deng and Saunders, 2001), während Ady2 (*accumulation of dyads 2*) an der Regulation der MP-Proteinmenge (Taxis *et al.*, 2005) und an der Aufnahme von Acetat (Paiva *et al.*, 2004) beteiligt ist. Sowohl die Deletion von *ADY1*, als auch die Deletion von *ADY2* führt zur überwiegenden Bildung von Dyaden, selbst unter guten Nährstoffbedingungen (Deng and Saunders, 2001; Taxis *et al.*, 2005;). Weiterhin scheint die Verstoffwechslung von Acetat durch den Glyoxylatzyklus für die Regulation der Sporenzahl wichtig zu sein. Die Deletion von bestimmten Komponenten aus dem Glyoxylatzyklus führt zur vermehrten Bildung von Dyaden (Nickas *et al.*, 2004). Eine weitere Beobachtung wurde mittels einer verkürzten *Ime2*-Variante gemacht, der 242 Aminosäuren des C-Terminus fehlen. Diese *ime2*-Mutante ist konstitutiv aktiv und wesentlich stabiler als das unmutierte Protein. Mutanten, die das C-Terminus verkürzte *Ime2* exprimierten, bildeten verstärkt Asci, die nur zwei Sporen enthielten (Sari *et al.*, 2008).

### **1.3 Regulation der Proteinmenge durch das TEV-Protease-induzierte-Proteininstabilitätssystem (TIPI-System)**

Um die Funktion eines Gens und des entsprechenden Genproduktes herauszufinden macht man häufig Gebrauch von Gendeletionen. Durch die Entfernung des Gens aus dem Genom und den daraus folgenden phänotypischen Konsequenzen werden dann Rückschlüsse auf die Funktion des Gens gezogen, eine Vorgehensweise die als reverse Genetik bezeichnet wird. Zur Untersuchung der Funktion von essentiellen Genen

werden konditionale Mutanten benutzt. Etabliert sind RNAi-Methoden, der Gebrauch von regulierbaren Promotoren, temperatursensitive Allele, chemische Inhibierung oder Inaktivierung von Proteinen, oder sogenannte, durch Hitze oder kleine Moleküle induzierbare Degrons, die die Degradation des zu untersuchenden Proteins vermitteln (Boutros and Ahringer, 2008; Dohmen and Varshavsky, 2005; Dohmen *et al.*, 1994; Mnaimneh *et al.*, 2004; Stack *et al.*, 2000).

Ein Degron ist eine Minimalsequenz, die einen negativen Einfluss auf die Proteinstabilität ausübt, indem sie den Abbau eines Proteins vermittelt. In vielen Fällen findet der Abbau zellulärer Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) statt. Das UPS ist in allen Eukaryoten hoch konserviert und dient dem gezielten Abbau von zytoplasmatischen Proteinen, ebenso wie Proteinen aus dem Zellkern und dem sekretorischen System (Kirschner, 1999). Substrate des UPS werden zunächst mit einer Polyubiquitinkette modifiziert, die als Signal für die Degradation des Substrates im 26S-Proteasom dient.

Ubiquitin (Ub) ist ein 9 kDa großes Protein und wird in einem ersten Schritt für die Konjugation an bestimmte Substrate, unter ATP-Verbrauch durch ein Ub-aktivierendes Enzym (E1) aktiviert. Bei diesem Prozess wird eine Thioester-Bindung zwischen Glycin 76 von Ub und einem Cystein-Rest des E1-Enzyms gebildet (Haas *et al.*, 1982). Als nächstes wird das aktivierte Ub in einer Transesterifizierungsreaktion auf ein Ub-konjugierendes Enzym (E2) übertragen, von dort aus wird es unter Ausbildung einer Isopeptidbindung auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins innerhalb des Substrates übertragen. Bei diesem letzten Schritt spielen die sogenannten E3-Enzyme, oder Ub-Protein-Ligasen eine wichtige Rolle, da sie die Degradationssignale innerhalb der Substrate erkennen. Die Mehrzahl der E3-Enzyme bildet mit einem passenden E2-Enzym einen Komplex, anschließend wird das Ub direkt vom E2-Enzym auf das Substrat übertragen (Hershko and Ciechanover, 1998). Der Komplex aus E2- und E3-Enzym katalysiert dann die Bildung einer Polyubiquitinkette, in der des C-terminale Glycin eines Ubs mit dem Lysin eines schon auf das Substrat übertragenen Ubs verbunden wird. Die Polyubiquitinkette eines Substrates wird direkt durch den regulatorischen 19S-Komplex des 26S Proteasoms erkannt und gebunden (Thrower *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* ist ein E1-Enzym (Uba1) bekannt, es existieren mindestens dreizehn verschiedene E2-Enzyme und eine Vielzahl unterschiedlicher E3-Enzyme, die alle unterschiedliche Degradationssignale erkennen (Hochstrasser, 1996; McGrath *et al.*, 1991; Weissman, 2001).

Das Proteasom ist eine ATP-abhängige Protease, die aus einer katalytischen 20S-Untereinheit und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten besteht. Die 20S-Untereinheit hat eine tonnenförmige Struktur in deren Innerem sich die eigentlichen, für die Proteolyse verantwortlichen, katalytischen Zentren befinden. Die zentrale Pore der 20S-Untereinheit wird von beiden Seiten durch die regulatorischen 19S-Komplexe, die eine Art Deckel über der zentralen Pore der 20S-Untereinheit bilden, verschlossen. Auf diese Weise wird die unspezifische Proteolyse von Proteinen verhindert. Die 19S-Untereinheiten sind für die Bindung und Entfaltung von Substraten des Ubiquitin-Proteasom-Systems zuständig. ATPasen in der Basis des Deckels entfalten das Substrat und transferieren es zur Degradation in die zentrale Kammer. Dieser Prozess erfordert Energie, die durch die Hydrolyse von ATP bereitgestellt wird (Pickart and Cohen, 2004).

Proteine beinhalten eine Vielzahl unterschiedlicher Degrons, die durch viele verschiedene E3-Enzyme erkannt werden (Ravid and Hochstrasser, 2008). Ein spezielles Degron, das sogenannte N-Degron, beinhaltet eine N-terminale Aminosäure, die sich negativ auf die Proteinestabilität auswirkt (Varshavsky, 1996). Dass die Halbwertszeit eines Proteins von seiner N-terminalen Aminosäure abhängt, wurde 1986 durch die Entdeckung des ersten Degradationssignals in kurzlebigen Proteinen erkannt (Bachmair *et al.*, 1986; Varshavsky, 1996). Das N-Degron in Eukaryoten besteht aus zwei essentiellen Bestandteilen, einer destabilisierenden Aminosäure am N-Terminus und einem oder mehreren Lysinen innerhalb des Substrates (Bachmair and Varshavsky, 1989; Suzuki and Varshavsky, 1999). In *S. cerevisiae* haben zwölf Aminosäuren (D, E, F, H, I, K, L, N, Q, R, W, und Y) einen destabilisierenden Einfluss auf ein Protein, wenn sie an dessen N-Terminus exponiert werden. Acht dieser Aminosäuren können direkt durch die Ubiquitin-Protein Ligase Ubr1 erkannt werden (Primär destabilisierende Aminosäuren), während vier vorher durch Arginylierung, beziehungsweise vor der Arginylierung durch Deaminierung modifiziert werden müssen (sekundär beziehungsweise tertiär destabilisierende Aminosäuren). Die Erkennung einer destabilisierenden Aminosäure am N-Terminus eines Proteins durch Ubr1 führt zur Polyubiquitinierung des Proteins und dessen Abbau im 26S-Proteasom (Mogk *et al.*, 2007; Varshavsky, 1996).

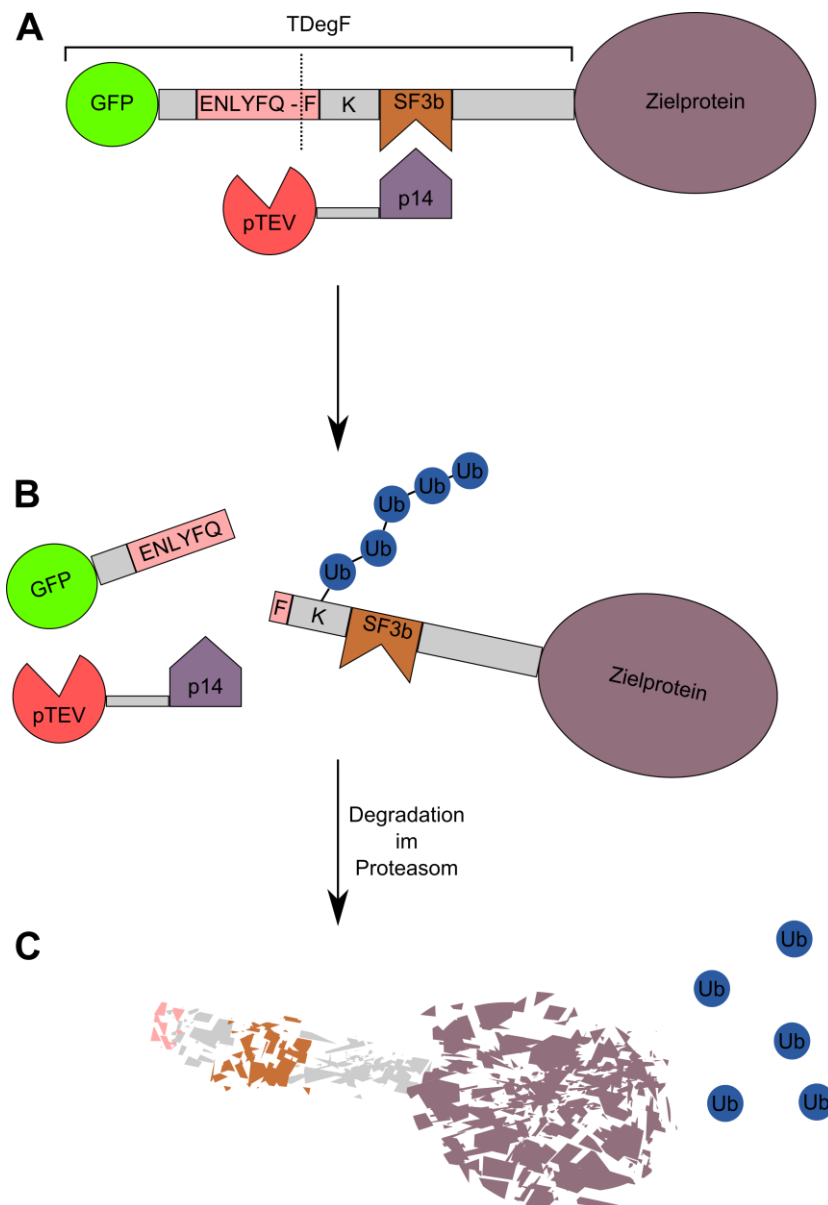
Um konditionale Mutanten zu erstellen wurde von Varshavsky und seinen Mitarbeitern ein temperatursensitives N-Degron entwickelt (Dohmen *et al.*, 1994). Die Methode beruht auf einer temperatursensitiven Variante der Dehydrofolatreduktase (DHFR), die

an ihrem N-Terminus einen Ubiquitinrest trägt. Dieser wird durch deubiquitinierende Enzyme abgeschnitten, was zur N-terminalen Exposition der destabilisierenden Aminosäure Arginin führt. Unter permissiven Bedingungen ist Arg-DHFR so gefaltet, dass das Arginin nicht exponiert ist. Unter restriktiven Bedingungen findet eine Umfaltung von Arg-DHFR statt, so dass Arginin frei am N-Terminus zugänglich ist. Dies führt zur Erkennung durch Ubr1, Polyubiquitinierung und Abbau von Arg-DHFR im Proteasom. Die Fusion von Ub-Arg-DHFR an Ura3 und Cdc28 unter restriktiven Bedingungen führte zu einem für diese Genprodukte spezifischen temperatursensitiven Phänotyp (Dohmen *et al.*, 1994).

Neben den beschriebenen N-Degrans existieren auch C-Degrans. Bei einem C-Degron hängt die Proteinstabilität von der C-terminalen Aminosäuresequenz ab. Ein Beispiel ist die Ornithindecaboxylase (ODC) aus der Maus, die durch das Proteasom unabhängig von Ubiquitin abgebaut wird (Murakami *et al.*, 1992). Verantwortlich für die Degradation sind die letzten 37 Aminosäuren des Proteins, in diesem Bereich befindet sich ein Cystein-Alanin (CA)-Motiv. Wenn das CA-Motiv etwa 20 Aminosäuren vom C-terminalen Ende entfernt ist, wird es direkt von der regulatorischen Untereinheit des Proteasoms erkannt und der Degradation zugeführt (Takeuchi *et al.*, 2007). Die das CA-Motiv umgebende Sequenz ist relativ beliebig austauschbar, sie darf nur keine Sekundär- und Tertiärstrukturen bilden (Takeuchi *et al.*, 2008).

Eine kürzlich entwickelte Methode zur Erzeugung konditionaler Mutanten mit Hilfe von N- oder C-Degrans ist das TEV-Protease-induzierte-Proteininstabilitätssystem (TIPI-System; Abbildung 6; Jungbluth *et al.*, 2010; Taxis *et al.*, 2009). Diese Methode macht Gebrauch von Degrans, die so gestaltet sind, dass sie erst nach Proteolyse durch die Tabak-Ätz-Virus -Protease (TEV-Protease) aktiviert werden. Die Degradation eines Zielproteins durch das TIPI-System kann mittels eines N-Degrans oder eines bidirektionalen Degrans erfolgen, das sowohl an den N-Terminus, als auch an den C-Terminus eines Proteins fusioniert werden kann. Das im TIPI-System und in dieser Arbeit verwendete N-Degron TDegF (Abbildung 6) besteht aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP), der Erkennungssequenz der TEV-Protease (ENYLFQ-F), sowie der Affinitätsdomäne SF3b155<sup>381-424</sup> und drei Hämagglutinin-Epitopen (3HA). Ein weiteres im TIPI-System Verwendung findendes Degron ist das bidirektionale GFP-cODC1-TDegF-Degron. Hierbei handelt es sich um eine Variation des TDegF-Degrans, die es zu einem bidirektionalen Degron macht (Jungbluth *et al.*, 2010).





**Abbildung 6: Das TEV-Protease-induzierte-Proteininstabilitäts-System (TIPI-System)**

A) Das im Tipi-System verwendete N-Degron TDegF besteht aus dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und der darauf folgenden Erkennungssequenz für die TEV-Protease (pTEV<sup>+</sup>) ENLYFQ-F. An Position 7 der Erkennungssequenz sitzt die Aminosäure Phenylalanin (F). Die Affinitätsdomäne SF3b155<sup>381-424</sup> (SF3b) bindet an p14<sup>D122Y</sup> (p14), das an die TEV-Protease fusioniert ist. Das TDegF-Degron wird N-Terminal an ein Zielprotein fusioniert. Die Expression von pTEV<sup>+</sup> wird durch einen regulierbaren Promotor (z.B. *GALI*-Promotor) induziert. B) Die TEV-Protease schneidet die Erkennungssequenz ENLYFQ-F zwischen Q und F. Dies führt zur Exposition der destabilisierenden Aminosäure Phenylalanin am N-Terminus des Zielproteins. Die Ubiquitin-Protein-Ligase Ubr1 erkennt das endständige Phenylalanin und polyubiquitiniert (Ub) in Kooperation mit Rad6 ein Lysin (K), das Teil des Degrons ist. C) Die Polyubiquitinkette ist ein Signal für die Degradation des Zielproteins im Proteasom. Die einzelnen Ubiquitin-Moleküle (Ub) werden recycelt und können für weitere Ubiquitinierungsreaktionen verwendet werden.

Die im TDegF-Degron verwendete Affinitätsdomäne SF3b155<sup>381-424</sup> bindet an die humane Spliceosom Untereinheit p14 (Spadaccini *et al.*, 2006), mit der die TEV-Protease modifiziert wurde. Allerdings wird eine mutierte Version von p14 (p14<sup>D122Y</sup>) verwendet, die eine höhere Prozessivität induziert. Eine weitere Verbesserung des Systems wurde durch Verkürzung der TEV-Protease erreicht. Durch Einführen eines Stop-Codons an Stelle 234 der TEV-Protease (TEV<sup>S219V 234STOP</sup>) wurde ihre Prozessivität

noch einmal gesteigert (Taxis *et al.*, 2009). Die verkürzte und mit p14<sup>D122Y</sup> modifizierte TEV-Protease wird als pTEV<sup>+</sup> bezeichnet.

Die Expression von pTEV<sup>+</sup> kann durch regulierbare Promotoren, wie den Galaktose-induzierbaren *GALI*-Promotor gesteuert werden. Die TEV-Protease schneidet die im TDegF-Degron enthaltene Erkennungssequenz ENLYFQ-F zwischen Q und F. Das schützende GFP wird abgeschnitten, am N-Terminus des Zielproteins wird durch die Proteolyse die destabilisierende Aminosäure Phenylalanin frei. Dies führt zur Erkennung des Degrons durch das Ubiquitin-Proteasom-System und zum Abbau des Zielproteins durch das Proteasom.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges auf die Sporulation und die Regulation der Sporenzahl untersucht werden. Im Zentrum der Untersuchungen stand die Frage, welchen Einfluss eine Erhöhung oder Verringerung der Aktivität des Signalweges bei verschiedenen Acetatkonzentrationen auf die Regulation der Sporenzahl hat. Eine weitere Frage war, ob die Menge an Acetat, ähnlich wie die Menge an Glukose, einen Einfluss auf die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges und damit auf die Zahl der produzierten Sporen hat. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, wie die Nährstoffverfügbarkeit während der Sporulation wahrgenommen und in Signale umgewandelt wird. Da sowohl die Bildung unterschiedlicher Mengen an meiotische Platte Proteinen, als auch die Bildung der meiotischen Platte selbst, essentiell für die Regulation der Sporenzahl sind, sollte untersucht werden, ob die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges einen Einfluss auf diese Prozesse hat.

Um die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges gezielt während der Meiose beeinflussen zu können, sollte das TIPI-System so modifiziert werden, dass es die Erzeugung Meiose-spezifischer Mutanten erlaubt.

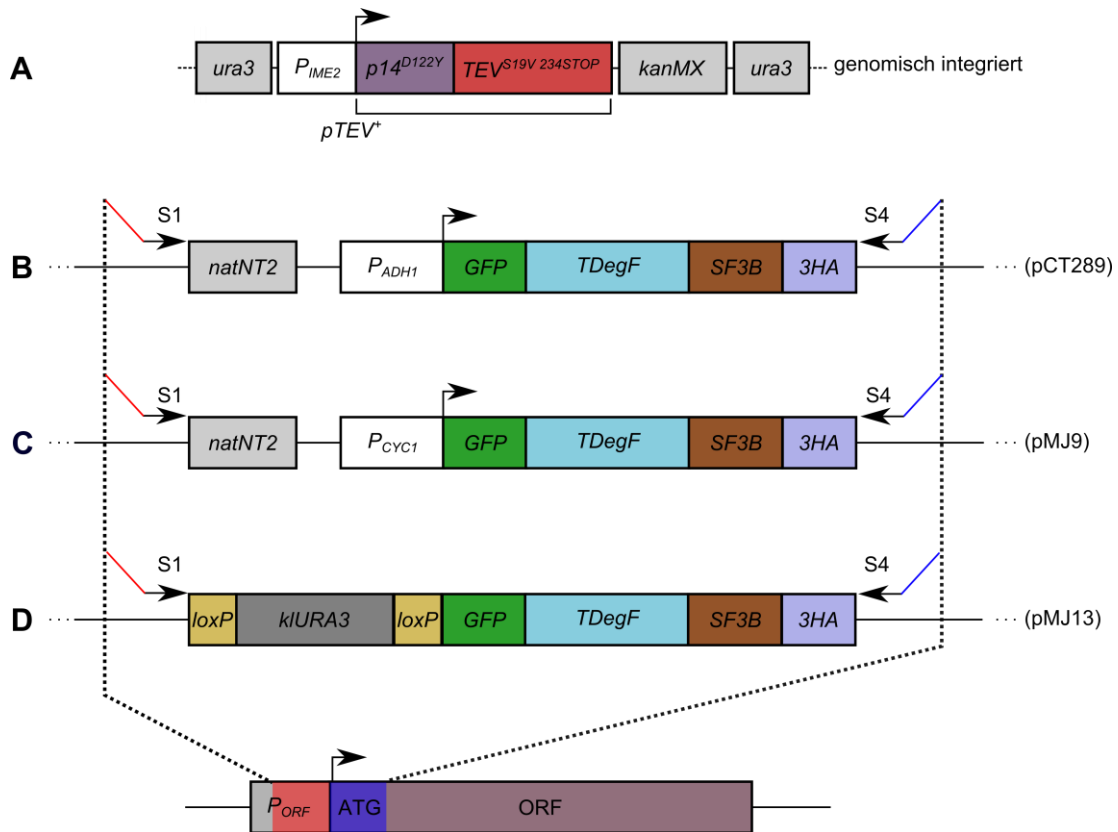
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Modifizierung des TIPI-Systems zur Erzeugung Meiose-spezifischer Mutanten

Um die Rolle von Signaltransduktionswegen, die an der Initiation der Sporulation beteiligt sind, während der Sporulation untersuchen zu können, war es nötig Mutanten herzustellen, die keine Defekte während des vegetativen Wachstums aufwiesen und in denen die Initiation der Meiose nicht gestört war. Aus diesem Grund war die Arbeit mit Deletionsmutanten in vielen Fällen nicht möglich. Meiose-spezifische Mutanten würden einen ungehinderten Eintritt in die Meiose ermöglichen und es erlauben, die Funktion von Signaltransduktionswegen während der Sporulation zu untersuchen. Deshalb sollte das TIPI-System verwendet werden, um Proteine während der Sporulation zu depletieren.

Im von Taxis *et al.*, entwickelten TIPI-System wird die *pTEV<sup>+</sup>*-Expression durch den Galaktose induzierbaren *GALI*-Promotor kontrolliert (Taxis *et al.*, 2009). Die Verwendung des *GALI*-Promotors ist während der Sporulation nicht möglich, da Galaktose die Initiation der Sporulation inhibiert. Das TIPI-System sollte daher so modifiziert werden, dass es die Herstellung Meiose-spezifischer Mutanten erlaubt. Um das zu erreichen sollte die Expression von *pTEV<sup>+</sup>* durch Promotoren kontrolliert werden, die ausschließlich während der Meiose aktiv sind. Gewählt wurden die Promotoren der Gene *ADY2*, *IME2*, *LEU1*, *MPC54* und *SPO74*. Die Promotoren der Gene *ADY2*, *IME2*, *LEU1* und *MPC54* sind früh in der Meiose aktiv, der von *SPO74* hingegen später (Chu *et al.*, 1998). Im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Christian Renicke wurden Plasmide hergestellt, die jeweils einen der fünf ausgewählten Promotoren, gefolgt von einer Genfusion aus *GFP* und *pTEV<sup>+</sup>* enthielten. Jedes dieser Plasmide wurde in einen Hefestamm transformiert, der durch ein mit dem rot fluoreszierenden Protein mKATE markiertes *Ime2* erlaubte, den Zeitpunkt der *pTEV<sup>+</sup>*-Expression im meiotischen Zellzyklus zu bestimmen. In den hergestellten Stämmen wurde Sporulation induziert und mittels der Fluoreszenz des GFP-*pTEV<sup>+</sup>* Fusionsproteins Zeitpunkt und Stärke der *pTEV<sup>+</sup>*-Expression bestimmt. Für alle Promotoren konnte gezeigt werden, dass *pTEV<sup>+</sup>* Meiose-spezifisch exprimiert wurde (Bachelorarbeit Christian Renicke, 2008). Für weitere Versuche wurde der *IME2*-Promotor ausgewählt, vor Allem weil er

sehr früh in der Meiose aktiv ist und die stärkste *pTEV<sup>+</sup>*-Expression vermittelte. Dafür sollte ein *P<sub>IME2</sub>-pTEV<sup>+</sup>* Konstrukt in das Genom von *S. cerevisiae* integriert werden. Es wurde daher in einen Vektor kloniert, der die Integration des Konstrukts mittels homologer Rekombination in den genomischen Locus des *URA3*-Gens erlaubt (pMJ11). Nach erfolgreicher Integration des *P<sub>IME2</sub>-pTEV<sup>+</sup>*-Konstrukts in das Genom von *S. cerevisiae* diente der so hergestellte Stamm (YMJ79) als Ausgangsstamm für weitere Experimente (Abbildung 7 A).



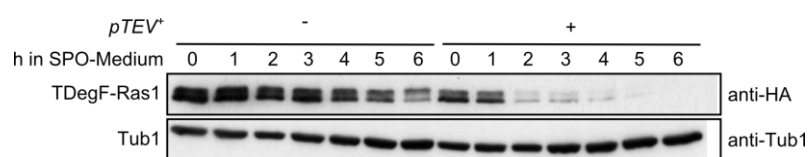
**Abbildung 7: Herstellung Meiose-spezifischer Mutanten mit Hilfe des TIPI-Systems**

A) Der Ausgangsstamm (YMJ79) exprimiert *pTEV<sup>+</sup>* unter Kontrolle des *IME2*-Promotors, das Konstrukt wurde in den *URA3*-Locus integriert. Um die Menge an *pTEV<sup>+</sup>* zu erhöhen, enthielt der Stamm zusätzlich das  $2\mu$ -Plasmid pDS37, das für *pTEV<sup>+</sup>* unter Kontrolle des *IME2*-Promotors kodiert. (B) Die Degradationsmarkierung *TDegF* wurde mittels PCR mit den Primern S1 und S4 von den Plasmiden pCT289 (B), pMJ9 (C) oder pMJ13 (D) amplifiziert. Das Plasmid pMJ13 erlaubt die Markierung von Zielgenen mit der *TDegF*-Markierung. Nach erfolgreicher Integration des Konstrukts befindet sich in 5'-Richtung vor dem ORF der von zwei *loxP*-Sequenzen markierte *klURA3*-Selektionsmarker (kl=*Kluyveromyces lactis*), der zur Selektion auf erfolgreiche Integration des Konstrukts dient. Das Zielgen wird nach der Fusion nicht mehr exprimiert, da das Konstrukt zwischen Promotor und Start-Codon des Gens integriert wird und keinen eigenen Promotor besitzt. Der *klURA3*-Marker kann nach erfolgreicher Integration durch Expression der sequenzspezifischen *cre*-Rekombinase wieder entfernt werden. Dabei bleibt eine *loxP*-Sequenz zurück und das Gen wird unter Kontrolle seines endogenen Promotors exprimiert. Der S1 Primer enthielt dem zu modifizierenden ORF entsprechende homologe Sequenzen (rot), selbiges galt für den S4 Primer (blau). Die homologen Sequenzen erlaubten die Integration des Degradationskonstrukts mittels homologer Rekombination in das Genom.

Für die Markierung von Proteinen mit einer Degradationsmarkierung standen verschiedene Plasmide zur Verfügung (Abbildung 7 B-D). Die Integration der Markierungen in das Genom erfolgte auf Basis einer PCR-basierten Integrationsmethode (Janke *et al.*, 2004). Neben einem bereits vorhandenen Plasmid, das die Degradationsmarkierung *TDegF* unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors enthielt

(pCT289, Abbildung 7 B), wurden in dieser Arbeit zwei weitere Plasmide hergestellt. In einem Plasmid steht das *TDegF*-Konstrukt unter Kontrolle des *CYCI*-Promotors, der schwächer als der *ADHI*-Promotor ist (pMJ9, Abbildung 7 C). Das zweite Plasmid (pMJ13, Abbildung 7 D) eignet sich zum wiederholten Markieren verschiedener Gene, die Entfernung des Selektionsmarkers nach der Integration basiert auf dem *cre/loxP*-System (Gauss *et al.*, 2005; Gueldener *et al.*, 2002; Guldener *et al.*, 1996). Es enthält stromaufwärts des *TDegF*-Konstrukts das *URA3*-Gen aus der Hefe *Kluyveromyces lactis* (*klURA3*), das von zwei *loxP*-Sequenzen, die von der sequenzspezifischen *cre*-Rekombinase erkannt werden flankiert wird. Nach Integration des Konstrukts vor das 5'-Ende eines Gens dient *klURA3* als Auxotrophiemarker zur Selektion auf erfolgreiche Integration. Dieser muss nach erfolgter Integration des Konstrukts wieder aus dem Genom entfernt werden, da das Konstrukt keinen eigenen Promotor besitzt. Das modifizierte Gen wird daher nicht exprimiert. Nach Entfernung des *klURA3*-Markers durch die *cre*-Rekombinase steht das Degradationskonstrukt wieder unter Kontrolle des endogenen Promotors des Gens.

Um zu überprüfen, ob das modifizierte TIPI-System zur Erzeugung Meiose-spezifischer Mutanten geeignet ist, sollte das Protein Ras1 spezifisch während der Meiose depletiert werden. Dazu wurde die *TDegF*-Degradationsmarkierung im Hefestamm YMJ79 N-Terminal an Ras1 fusioniert. Nach Induktion der Sporulation wurde das Verhalten von Ras1 mittels Western-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass Ras1 wie erwartet Meiose-spezifisch depletiert wurde (Abbildung 8).



#### Abbildung 8: Meiose-spezifische Depletion von Ras1

Immunoblot zur Überprüfung der Depletion von Ras1. Um Ras1 mit Hilfe des Meiose-spezifischen TIPI-Systems zu depletieren, wurde die Degradationsmarkierung *TDegF* N-Terminal an Ras1 fusioniert. Sporulation wurde durch Umsetzen der Zellen in Sporulationsmedium mit 1 % KOAc (SPO-Medium) induziert. Nach Induktion der Meiose in Zellen ohne *pTEV<sup>+</sup>* (YMJ45-1) und mit *pTEV<sup>+</sup>* (YMJ82-1) wurden stündlich Proben für das Immunoblot-Experiment entnommen. Anwesenheit von *pTEV<sup>+</sup>* führte zu einer schnellen Degradation von Ras1 nach Initiation der Meiose. Nachweis von Tub1 diente als Ladekontrolle. *TDegF*-Ras1 wurde mit einem anti-HA Antikörper, Tub1 mit einem anti-Tub1 Antikörper nachgewiesen.

Bereits zwei Stunden nach Initiation der Meiose konnten nur noch Restmengen an Ras1 nachgewiesen werden, die sich dadurch erklären, dass Zellen, die nicht sporulieren auch keine TEV-Protease exprimieren. In Kontrollstämmen, die kein *pTEV<sup>+</sup>* enthielten, konnte eine leichte Abnahme der Ras1-Proteinmenge beobachtet werden. Dies erklärt sich durch die Tatsache, dass der konstitutiv aktive *ADHI*-Promotor während der Meiose nicht aktiv ist. Letztlich unterstützt dies aber den Abbau eines Proteins während

der Meiose, da durch die Inaktivierung des Promotors zeitgleich mit Beginn der Depletion des Proteins auch seine Expression gestoppt wird. Die Degradationsmarkierung wurde nur an eine von zwei *RAS1*-Genkopien fusioniert, die Zellen enthielten demnach noch unmarkiertes Ras1. Des Weiteren ist bekannt, dass Ras1 und Ras2 teilweise redundante Funktionen besitzen (Kataoka *et al.*, 1984). Aus diesem Grund sporulierten die Zellen trotz Reduktion der Ras1-Proteinmenge normal.

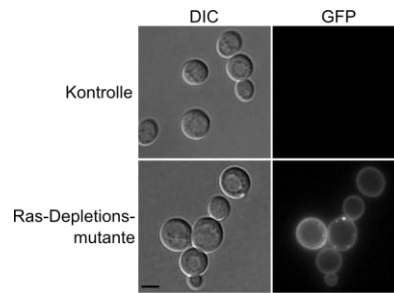
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das TIPI-System in Kombination mit Meiose-spezifischer Expression von *pTEV<sup>+</sup>* durch den *IME2*-Promotor für die Erzeugung Meiose-spezifischer Mutanten eignet.

## 2.2 Modulation der PKA-Aktivität während der Meiose

### 2.2.1 Verringerung der PKA-Aktivität durch Depletion der Cyr1 Effektoren Ras1 und Ras2

Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg ist für das vegetative Wachstum essentiell. Ein vollständiger Verlust der PKA-Aktivität resultiert in einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus (Matsumoto *et al.*, 1982). Weiterhin ist bekannt, dass der Eintritt in die Meiose durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird (Donzeau and Bandlow, 1999; Matsuura *et al.*, 1990). Der Einfluss des Signaltransduktionsweges auf die meiotischen Zellteilungen und die Regulation der Sporenzahl ist jedoch kaum untersucht worden. Um zu untersuchen, welchen Einfluss der cAMP/PKA Signaltransduktionsweg auf die Meiose und die Regulation der Sporenzahl hat, sollte die Aktivität des Signaltransduktionsweges während der Meiose gezielt beeinflusst werden.

Die Proteine Ras1 und Ras2 üben einen positiven Einfluss auf die Aktivität der Proteinkinase A aus, da sie die Adenylylzyklase Cyr1 aktivieren (Broek *et al.*, 1985; Toda *et al.*, 1985). Um zu untersuchen welchen Einfluss Ras1 und Ras2 auf die Sporulation haben, sollten beide Proteine gleichzeitig Meiose-spezifisch depletiert werden. Dafür wurden Ras1 und Ras2 N-terminal mit der Degradationsmarkierung TDegF markiert. Eine Überprüfung der Lokalisation von Ras1 und Ras2 in vegetativ wachsenden Zellen zeigte eine Lokalisation an der Plasmamembran (Abbildung 9), wie es für Ras1 und Ras2 zu erwarten ist (Dong and Bai, 2011; Leadsham *et al.*, 2009).



### Abbildung 9: Lokalisation von TDegF-Ras1 und -Ras2 in vegetativ wachsenden Zellen

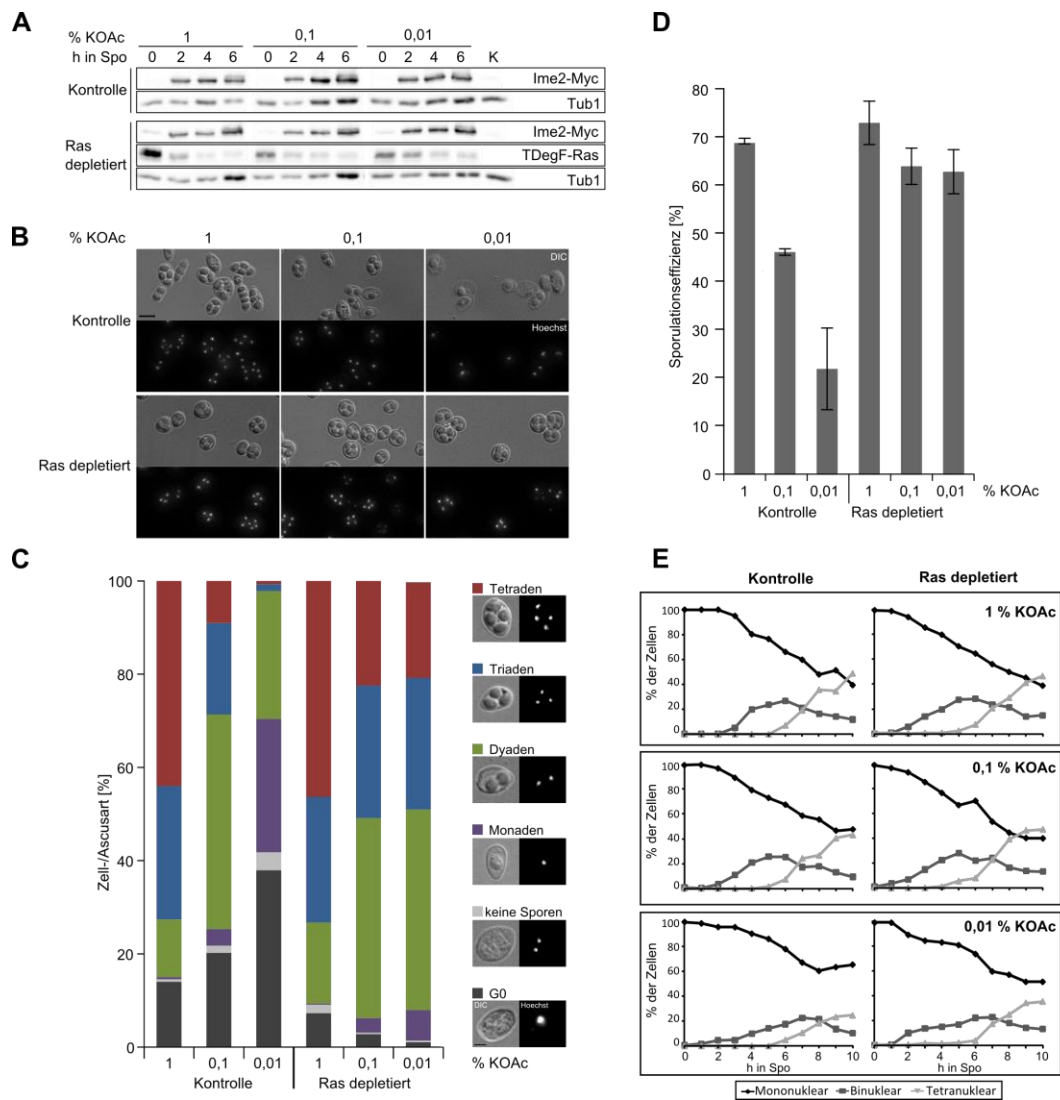
Überprüfung der Lokalisation von TDegF-Ras1 und -Ras2. Für das Experiment wurden ein Kontrollstamm ohne fluoreszierende Konstrukte (YKS32) und der Ras-Depletionsstamm (YMJ85) verwendet. Die Zellen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase. Gezeigt sind Aufnahmen mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) und mit GFP-Filter. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu\text{m}$ .

Nach Induktion der Sporulation wurde die Depletion von Ras1 und Ras2 (im Folgenden nur Ras genannt) mittels Immunoblot untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Ras während der Meiose nicht ausreichend depletiert wurde. Vermutlich wurde nicht genügend  $pTEV^+$  exprimiert um Ras vollständig zu depletieren. Aus diesem Grund wurde in den Hefestamm ein  $2\mu$ -Plasmid<sup>2</sup> transformiert, das  $P_{IME2}\text{-GFP-}pTEV^+$  enthielt (pDS37). Auf diese Weise sollte die Menge von  $pTEV^+$  während der Meiose erhöht werden.

Um die Depletion von Ras in dem pDS37-tragenden Stamm zu überprüfen wurde die Sporulation bei 1 %, 0,1 % und 0,01 % Kaliumacetat induziert. Für eine Western-Analyse wurden zweistündlich Proben entnommen. So konnte gezeigt werden, dass Ras bei allen drei Kaliumacetatkonzentrationen depletiert wurde (Abbildung 10 A). Da bekannt ist, dass die Proteinmenge von Ime2 durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird, wurde sie im Ras-Depletionsstamm und im Kontrollstamm überprüft. Dabei zeigte sich, dass es zwischen beiden Stämmen keinen Unterschied in Menge und zeitlicher Koordinierung der Ime2-Produktion gab. Weiterhin hatten unterschiedliche Kaliumacetatkonzentrationen in beiden Stämmen keinen Einfluss auf die Ime2-Produktion (Abbildung 10 A). Dies zeigte, dass die Bildung von Ime2 nicht an unterschiedliche Nährstoffbedingungen angepasst wurde.

Eine mikroskopische Analyse des Kontrollstammes und des Ras-Depletionsstammes zeigte, dass die Sporenzahl im Kontrollstamm mit sinkender Kaliumacetatkonzentration abnahm. Im Ras-Depletionsstamm wurden hingegen selbst bei geringen Kaliumacetatkonzentrationen noch Tetraden und Triaden gebildet (Abbildung 10 B). Die Quantifizierung der Sporulation in beiden Stämmen zeigte, dass im Kontrollstamm

<sup>2</sup> Ein  $2\mu$ -Plasmid vermehrt sich selbständig und liegt in etwa 70 Kopien pro Zelle vor (Hartley and Donelson, 1980). Die Expression eines Gens mittels eines  $2\mu$ -Plasmids kommt einer Überexpression des Gens gleich.



**Abbildung 10: Auswirkungen der Meiose-spezifischen Depletion von Ras1 und Ras2 auf die Sporulation**

**A)** Western-Analyse zur Überprüfung der Depletion von Ras und der Ime2-Proteinmenge. Für das Experiment wurden ein Kontrollstamm (YMJ179), sowie der Ras-Depletionsstamm (YMJ195 + pDS37) verwendet. Als Negativkontrolle (K) diente ein Wildtypstamm (YKS32), aufgetragen wurde in diesem Fall eine Proteinprobe, die 6 h nach Initiation der Meiose aufbereitet wurde. Für die Western-Analyse wurde zu den angegebenen Zeitpunkten eine 2 OD<sub>600</sub> entsprechende Zellmenge entnommen. TDegF-Ras1 und -Ras2 wurden mit einem anti-HA-Antikörper, Ime2-9Myc mit einem anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Tub1 mit einem anti-Tub1-Antikörper diente als Ladekontrolle. **B)** Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der zellmorphologischen Phänotypen bei Depletion von Ras während der Meiose. Es wurde ein Kontrollstamm (YKS32) und der Ras-Depletionsstamm (YMJ85 + pDS37) verwendet. Auf SPO-Agarplatten sporulierte Zellen wurden mit Hoechst 33342 angefärbt und einer mikroskopischen Analyse unterzogen. Die Bilder wurden entweder mit Differentiellem Interferenz Kontrast (DIC) oder im Falle der Hoechst-Färbung mit DAPI-Fluoreszenzfilter aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 4 µm. **C)** Quantifizierung der beobachteten Phänotypen aus dem in B) beschriebenen Experiment. Pro Bedingung und Stamm wurden in jedem Fall mehr als 200 Zellen gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. In der Auswertung berücksichtigt wurden Zellen, die keine Meiose initiiert haben (G0), Zellen, die die Meiose eingeleitet, aber keine Sporen gebildet haben (keine Sporen) und Zellen mit vier (Tetraden), drei (Triaden), zwei Sporen (Dyaden) oder einer Spore (Monade). Der Maßstabsbalken entspricht 4 µm. **D)** Sporulationseffizienz der Stämme aus dem in B) beschriebenen Experiment. Gezeigt sind Mittelwerte von Messungen zweier Transformanden aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. **E)** Quantifizierung des zeitlichen Ablaufes der meiotischen Teilungen in einem Kontrollstamm (YKS32) und dem Ras-Depletionsstamm (YMJ195 + pDS37). Zu Beginn der Initiation der Sporulation, sowie stündlich bis 10 h nach Initiation der Sporulation wurde je eine Zellmenge, die einer OD<sub>600</sub> von 1 entspricht, entnommen und mit Hoechst 33342 angefärbt. Pro Zeitpunkt wurden in jedem Fall mehr als 200 Zellen gezählt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Berücksichtigt wurden Zellen mit einem Hoechst-Signal (Mononuklear; G0-Phase des Zellzyklus), mit zwei Hoechst-Signalen (Binuklear; Meiose I) oder mit vier Hoechst-Signalen (Tetraklear, Meiose II).



die Zahl der Tetraden und Triaden mit sinkender Kaliumacetatkonzentration abnahm, während die Zahl der Dyaden, Monaden und unsporulierten Zellen zunahm (Abbildung 10 C). Der Ras-Depletionsstamm zeigte zwischen 1 % und 0,1 % Kaliumacetat eine leichte Abnahme der Tetradenzahl, passte die Regulation der Sporenzahl im Gegensatz zum Kontrollstamm zwischen 0,1 und 0,01 % Kaliumacetat aber nicht an (Abbildung 10 C). Anschließend wurde die Sporulationseffizienz ermittelt, die ein Maß für die Gesamtheit der in einer Kultur produzierten Sporen ist. Eine Sporulationseffizienz von 100 % würde bedeuten, dass jede sporulierte Zelle vier Sporen gebildet hat. Im Gegensatz zum Kontrollstamm änderte sich die Sporulationseffizienz im Ras-Depletionsstamm kaum (Abbildung 10 D). Dieses Ergebnis zeigt, dass Ras essentiell für die Regulation der Sporenzahl in Abhängigkeit der verfügbaren Acetatmenge ist. Ebenfalls lässt sich aus dem Ergebnis ein negativer Einfluss des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges auf die Sporenbildung ableiten, da in Abwesenheit von Ras in der Kultur insgesamt mehr Sporen gebildet wurden.

In einem nächsten Experiment sollte überprüft werden, ob die Meiose im Ras-Depletionsstamm verfrüht initiiert wird und ob die meiotischen Teilungen anders ablaufen, als im Kontrollstamm. Um dies zu überprüfen, wurde in beiden Stämmen der zeitliche Ablauf der meiotischen Teilungen durch Färbung der DNA mit Hoechst 33342 untersucht. Es wurde zwischen Zellen mit einem Hoechst-Signal (G0), zwei Hoechst-Signalen (Meiose I) und vier Hoechst-Signalen (Meiose II) unterschieden. Zum Zeitpunkt 0 h wiesen alle Zellen beider Stämme nur ein Hoechst-Signal auf. Dies zeigt, dass sie sich in der G0-Phase des Zellzyklus befanden und noch keine Initiation der Meiose stattfand. Ras-depletierte Zellen begannen mit den meiotischen Teilungen etwa eine Stunde früher als Kontrollzellen. In beiden Stämmen führten abnehmende Kaliumacetatkonzentrationen zu einer zeitlichen Verzögerung der meiotischen Teilungen (Abbildung 10 E).

Dies zeigt, dass die Depletion von Ras keinen erheblichen Einfluss auf die Initiation der Meiose und die meiotischen Teilungen hat. Der Verlust der Sporenzahlkontrolle muss also durch eine Störung in der Erkennung oder Weiterleitung des Nahrungssignals begründet sein. Des Weiteren zeigte sich, dass die Nährstoffsituation nicht nur einen Einfluss auf die Zahl der gebildeten Sporen, sondern auch auf den zeitlichen Ablauf der meiotischen Teilungen hat.

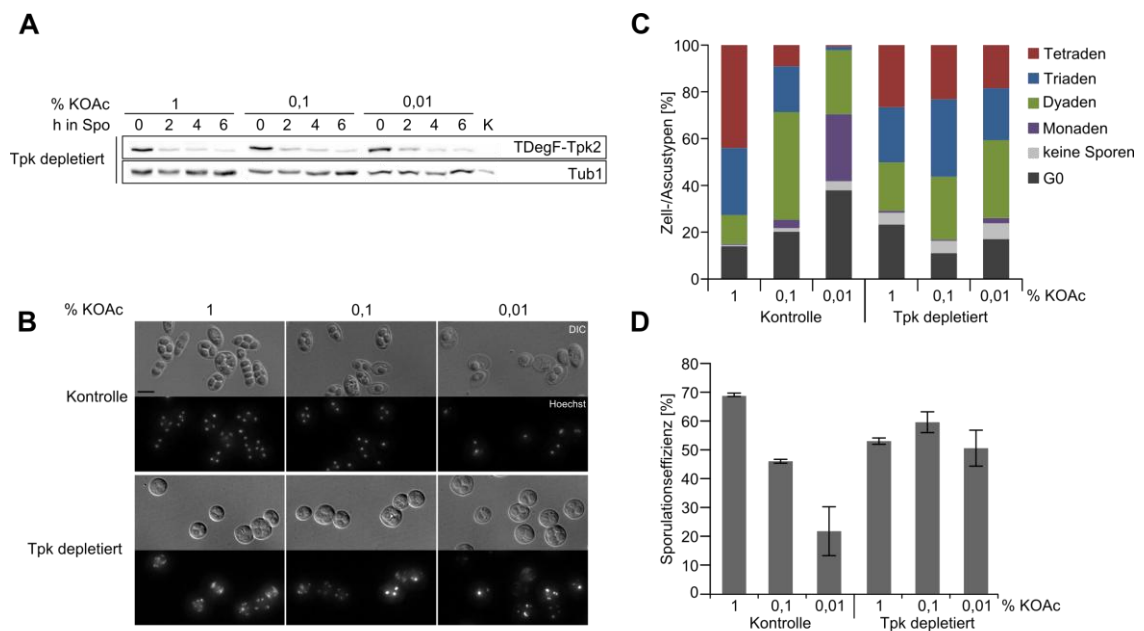
### 2.2.2 Verringerung der PKA-Aktivität durch Depletion der katalytischen PKA-Untereinheiten

Eine weitere Möglichkeit die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges zu beeinflussen, ist die Depletion der katalytischen PKA-Untereinheiten Tpk1, Tpk2 und Tpk3. Die Chance, drei Proteine gleichzeitig erfolgreich zu depletieren wurde als gering eingestuft, da bereits die Depletion von zwei Proteinen, im Fall von Ras1 und Ras2, nur unter zu Hilfenahme des Plasmides pDS37 möglich war. Desweiteren ist die Modifikation von vier Genen (*TPK1-3* und *pTEV<sup>+</sup>* im *URA3*-Lokus) aufgrund der geringen Zahl verfügbarer Selektionsmarker nicht ohne Weiteres möglich. Um die Proteinkinase A während der Meiose zu inaktivieren, wurden deshalb die Gene der PKA-Untereinheiten *TPK1* und *TPK3* deletiert, während Tpk2 durch Modifikation mit der N-terminalen Degradationsmarkierung TDegF unter Verwendung des Meiose-spezifischen TIPI-Systems depletiert werden sollte. Zur Modifikation von *TPK2* wurde das oben beschriebene *cre/lox*-basierte Degradationskonstrukt verwendet (pMJ13). Daher befand sich *TDegF-TPK2* unter Kontrolle des endogenen *TPK2*-Promotors. Im Folgenden wird dieser Stamm zur einfacheren Benennung Tpk-Depletionsstamm genannt.

Zunächst wurde auch im Tpk-Depletionsstamm die Lokalisation des Degradationskonstrukts unter vegetativen Bedingungen überprüft. Für Tpk2 wird in der Literatur eine Lokalisation im Zellkern der Zelle (Huh *et al.*, 2003), beziehungsweise je nach Wachstumsphase und verfügbarer Kohlenstoffquelle, im Zytoplasma oder in Stresskörpern (*P-bodies*) beschrieben (Tudisca *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte keine spezifische Lokalisation des Tpk2-Degradationskonstruktes erkannt werden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass das Fehlen von *TPK1* und *TPK3* in diesem Stamm die Lokalisation von Tpk2 beeinträchtigt. Es ist aber davon auszugehen, dass das markierte Tpk2 funktionell ist, da zumindest eine der drei katalytischen Untereinheiten der PKA für das Überleben der Zelle benötigt wird (Toda *et al.*, 1987b).

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen die Meiose-spezifische Tpk-Depletion auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle hat, wurde in der Tpk-Depletionsmutante und einem Kontrollstamm die Sporulation bei drei verschiedenen Kaliumacetatkonzentrationen induziert. Die Depletion von Tpk2 wurde mittels Western-Analyse überprüft. So konnte gezeigt werden, dass Tpk2 bei allen drei Kaliumacetatkonzentrationen während der Meiose depletiert wurde (Abbildung 11 A).

Eine mikroskopische Überprüfung der Kulturen ergab, dass die Tpk-Depletionsmutante, ähnlich wie die Ras-Depletionsmutante bei allen drei Kaliumacetatkonzentrationen Tetraden und Triaden produzierte und nicht mehr auf unterschiedliche Kaliumacetatkonzentrationen reagierte (Abbildung 11 B). Eine Auszählung der verschiedenen Zell- und Ascustypen in den Kulturen bestätigte, dass die Tpk-Depletionsmutante bei unterschiedlichen Kaliumacetatkonzentrationen kaum Änderungen in der Verteilung der Ascustypen zeigte (Abbildung 11 C). Deutlich zeigte sich die gestörte Sporenzahlkontrolle bei der Sporulationseffizienz, die im Kontrollstamm mit sinkender Kaliumacetatkonzentration abnahm, sich im Tpk-Depletionsstamm aber kaum änderte (Abbildung 11 D).



#### Abbildung 11: Auswirkung der Tpk-Depletion auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle

**A)** Western-Analyse zur Überprüfung der Meiose-spezifischen Depletion von Tpk2. Für das Experiment wurde der Stamm YMJ209 + pDS37 verwendet. Als Negativkontrolle (K) diente ein Wildtypstamm (YKS32). Die Durchführung des Experimentes erfolgte wie in Abbildung 10 A beschrieben. TdegF-Tpk2 wurde mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Tub1 mit einem anti-Tub1-Antikörper diente als Ladekontrolle. **B)** Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der zellmorphologischen Phänotypen bei Meiose-spezifischer Depletion von Tpk2. Es wurde ein Kontrollstamm (YKS32) und der Tpk2-Depletionsstamm (YMJ209 + pDS37) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 10 B beschrieben. Der Maßstabsbalken entspricht 4 µm. **C)** Quantifizierung der beobachteten Phänotypen aus dem in B) beschriebenen Experiment. Durchführung wie in Abbildung 10 C beschrieben. **D)** Sporulationseffizienz der Stämme aus dem in B) beschriebenen Experiment. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben.

Um zu überprüfen ob eine spezifische katalytische Untereinheit der Proteinkinase A an der Regulation der Sporenzahl beteiligt ist, wurden Einzeldelationen der Gene *TPK1*, *TPK2* und *TPK3* hergestellt. Alle drei Deletionsstämme sporulierten vergleichbar mit dem Kontrollstamm (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass keine spezifische Untereinheit allein an der Regulation der Sporenzahl beteiligt ist. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass die Proteinkinase A für die Regulation der Sporenzahl

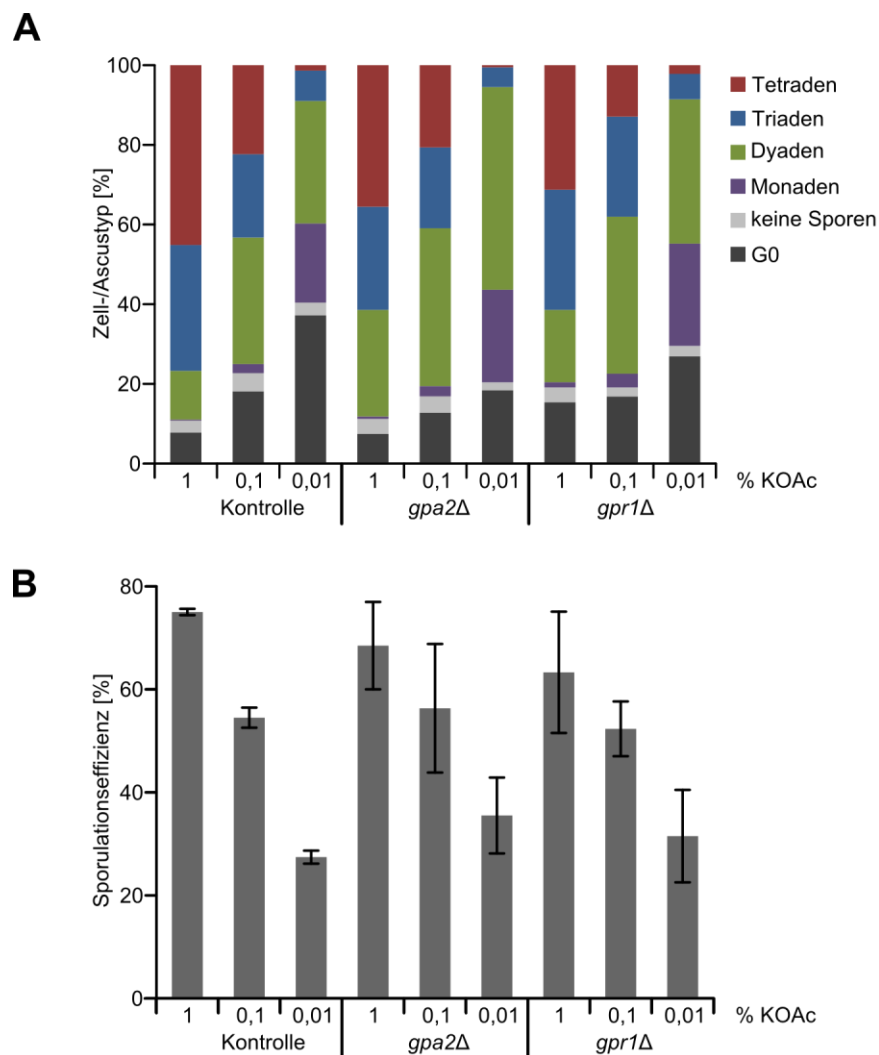
essentiell ist. Wie auch schon im Fall der Ras-Depletion lässt sich auch anhand der Tpk-Depletion erkennen, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg einen negativen Einfluss auf die Sporenbildung hat, da bei mittleren und niedrigen Kaliumacetatkonzentrationen in der Kultur insgesamt mehr Sporen gebildet wurden, als im Kontrollstamm.

### 2.2.3 Verringerung der PKA-Aktivität durch Depletion von Cyr1

Die bisherigen Experimente zeigten, dass eine Verringerung der Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges während der Meiose zu einem Verlust der Sporenzahlkontrolle führte. Es sollte nun überprüft werden, ob auch die Meiose-spezifische Depletion der Adenylylzyklase Cyr1 zu einem ähnlichen Ergebnis führt. Daher wurde Cyr1 N-Terminal mit der Degradationsmarkierung TDegF modifiziert. Es wurden zwei verschiedene Integrationskonstrukte verwendet, so dass *TDegF-CYR1* in einem Stamm unter Kontrolle des starken *ADHI*-Promotors (YMJ123) und in einem anderen unter Kontrolle des schwächeren *CYCI*-Promotors (YMJ121) stand. Anschließend wurden die Mutanten in ihrem Sporulationsverhalten überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass sich alle Transformanden unterschiedlich verhielten. Einige Transformanden sporulierten vergleichbar mit Kontrollstämmen, andere waren nicht in der Lage zu sporulieren. Neben den N-terminalen Degradationsmarkierungen wurde auch eine C-terminale Degradationsmarkierung verwendet, die den Vorteil bot, dass die Expression von *CYR1* vom eigenen Promotor kontrolliert wurde. So sollte ausgeschlossen werden, dass die zwischen verschiedenen Transformanden variierenden Ergebnisse in einer veränderten *CYR1* Expression begründet lagen. Allerdings bot sich in diesem Fall das gleiche Bild. Einige Transformanden waren in der Lage zu sporulieren, andere nicht (C. Taxis, persönliche Kommunikation). Um zu überprüfen, in welchen der Transformanden Cyr1 depletiert wurde, sollte die Proteinmenge von Cyr1 mit Hilfe des in der Degradationsmarkierung enthaltenen Hämagglutinin-Epitops bestimmt werden. Allerdings konnte Cyr1 mittels Western-Analyse nicht detektiert werden. Daher war es nicht möglich auf diesem Weg ein eindeutiges Ergebnis zur Bedeutung von Cyr1 für die Sporenzahlkontrolle zu erhalten.

## 2.2.4 Einfluss des G-Protein-gekoppelten Glukoserezeptors Gpr1 und des G-Proteins Gpa2 auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle

Die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges wird unabhängig von Ras1 und Ras2 durch den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Gpr1 und das dazugehörige  $G\alpha$ -Protein Gpa2 beeinflusst (Xue *et al.*, 1998). Gpr1 und Gpa2 werden speziell für die durch Glukose induzierte cAMP-Produktion benötigt (Kraakman *et al.*, 1999).



**Abbildung 12: Einfluss der Deletion von *GPR1* und *GPA2* auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle**

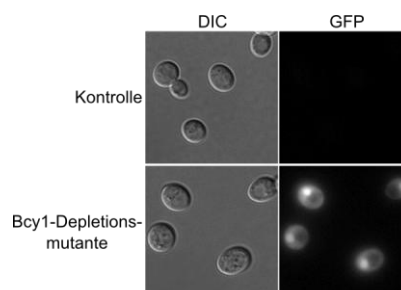
**A)** Quantifizierung der bei der Sporulation entstandenen Zell- und Ascustypen eines Kontrollstammes (YKS32), einer *gpr1*- (YMJ208) und einer *gpa2*-Deletionsmutante (YMJ180). Durchführung wie in Abbildung 10 C beschrieben. **B)** Sporulationseffizienz von Kontrollstämmen, *gpa2*Δ- und *gpr1*Δ-Mutanten, aus dem in A beschriebenen Experiment. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben.

Um zu überprüfen, ob Gpr1 und Gpa2 auch einen Einfluss auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle haben, wurden *gpr1*Δ- und *gpa2*Δ-Mutanten hergestellt. Nach der Sporulation der Mutanten bei drei verschiedenen Kaliumacetatkonzentrationen wurden die gebildeten Zell- und Ascustypen mit denen eines Kontrollstammes verglichen.

Dabei stellte sich heraus, dass sowohl die *gpr1Δ*-Deletionsmutante, als auch die *gpa2Δ*-Deletionsmutante vergleichbar mit dem Kontrollstamm sporulierten. Beide Mutanten wiesen jedoch bei geringen Kaliumacetatkonzentrationen (0,1 % und 0,01 %) weniger unsporulierte Zellen auf. Dies könnte durch verringerte PKA-Aktivität und damit erhöhten Eintritt in die Meiose in diesen Mutanten begründet sein (Abbildung 12 A). Die Sporulationseffizienz war dementsprechend, verglichen mit der Kontrolle bei geringen Kaliumacetatkonzentrationen, leicht höher (Abbildung 12 B). Insgesamt kann aber gesagt werden, dass im Hinblick auf die Regulation der Sporenzahl keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und der Kontrolle erkennbar waren. Die Aktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges über Gpr1 und Gpa2 spielt demnach keine nennenswerte Rolle bei der Regulation der Sporenzahl.

### 2.2.5 Erhöhung der PKA-Aktivität durch Depletion der regulatorischen PKA-Untereinheit Bcy1

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass eine Verringerung der Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges zu einem Verlust der Sporenzahlkontrolle führte. Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss die Aktivierung des Signaltransduktionsweges während der Meiose hat. Dazu sollte Bcy1, die regulatorische Untereinheit der PKA, während der Meiose depletiert werden. Da Bcy1 einen negativen Einfluss auf die PKA ausübt (Toda *et al.*, 1987a), würde die Depletion des Proteins in einer PKA Aktivierung resultieren. Um Bcy1 Meiose-spezifisch zu depletieren, wurde es N-Terminal mit der TDegF-Degradationsmarkierung modifiziert. Zunächst wurde die Lokalisation des Bcy1-Degradationskonstruktes in vegetativ wachsenden Zellen unter permissiven Bedingungen untersucht. Das Bcy1-Degradationskonstrukt lokalisierte

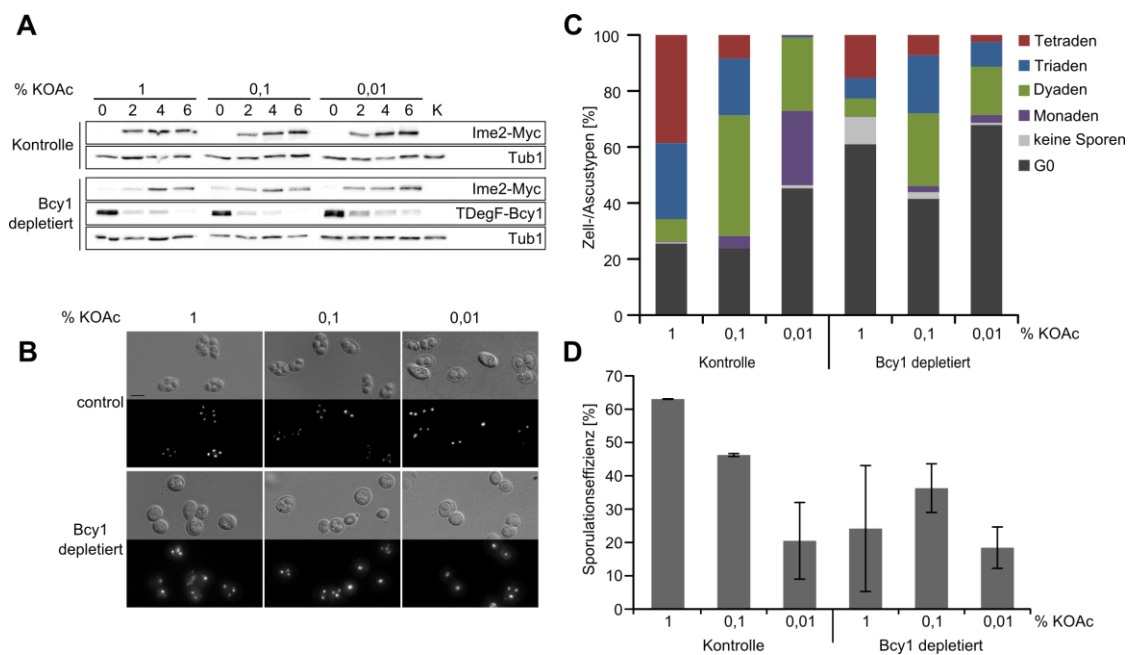


**Abbildung 13: Lokalisation des Bcy1-Degradationskonstruktes in vegetativ wachsenden Zellen**

Überprüfung der Lokalisation von TDegF-Bcy1. Für das Experiment wurden ein Kontrollstamm ohne fluoreszierende Konstrukte (YKS32) und der Bcy1-Depletionsstamm (YMJ99) verwendet. Die Zellen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase. Gezeigt sind Aufnahmen mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) und mit GFP-Filter. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu$ m.

hauptsächlich im Zellkern und zu einem kleinen Teil im Cytoplasma (Abbildung 13). Dies entspricht der Lokalisation, die in der Literatur für Bcy1 beschrieben ist (Huh *et al.*, 2003).

Anschließend wurde im Bcy1-Depletionsstamm und einem Kontrollstamm bei drei verschiedenen Kaliumacetatkonzentrationen die Sporulation induziert und die Bcy1-Depletion sowie die Ime2-Proteinmenge durch eine Western-Analyse bestimmt. So konnte gezeigt werden, dass Bcy1 bei allen Kaliumacetatkonzentrationen Meiose-spezifisch depletiert wurde (Abbildung 14 A). Sowohl im Kontrollstamm, als auch in der Bcy1-Depletionsmutante nahm die Ime2-Proteinmenge ab zwei Stunden nach Induktion der Sporulation stetig zu. Allerdings wurde im Bcy1-Depletionsstamm insgesamt weniger Ime2 produziert, als im Kontrollstamm. Wie auch schon im Experiment zur Überprüfung der Ras-Depletion zeigte sich, dass die Menge an Kaliumacetat keinen Einfluss auf die Ime2-Menge hat (Abbildung 14 A).



**Abbildung 14: Einfluss der Meiose-spezifischen Depletion von Bcy1 auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle**

**A)** Western-Analyse zur Überprüfung der Meiose-spezifischen Depletion von Bcy1 und der Ime2-Menge. Für das Experiment wurden ein Kontrollstamm benutzt (YMJ179), sowie der Bcy1-Depletionsstamm (YMJ221 + pDS37). Als Negativkontrolle (K) diente ein Wildtypstamm (YKS32). Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 10 A beschrieben. TDegF-Bcy1 wurde mit einem anti-HA-Antikörper, Ime2-9Myc mit einem anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Tub1 mit einem anti-Tub1-Antikörper diente als Ladekontrolle. **B)** Licht- und Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der zellmorphologischen Phänotypen bei Depletion von Bcy1 während der Meiose. Es wurden ein Kontrollstamm (YKS32) und ein Bcy1-Depletionsstamm (YMJ99 + pDS37) benutzt. Die Durchführung erfolgte wie in Abbildung 10 B beschrieben. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu$ m. **C)** Quantifizierung der beobachteten Phänotypen aus dem in B) beschriebenen Experiment. Durchführung wie in Abbildung 10 C beschrieben. **D)** Sporulationseffizienz der Stämme aus dem in B) beschriebenen Experiment. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben.

Bei der Überprüfung der Sporulation zeigte sich, dass der Bcy1-Depletionsstamm wesentlich schlechter sporulierte als der Kontrollstamm, es konnte eine hohe Zahl unsporulierter Zellen beobachtet werden (Abbildung 14 B). Eine Quantifizierung der nach der Sporulation entstandenen Zell- und Ascustypen ergab, dass im Bcy1-Depletionsstamm bei jeder Kaliumacetatkonzentration zwischen 40 und 60 % der Zellen unsporuliert waren (Abbildung 14 C). Dies führte zu einer im Vergleich zum Kontrollstamm bei allen Kaliumacetatkonzentrationen verringerten Sporulationseffizienz (Abbildung 14 D). Eine weitere Beobachtung war, dass die im Bcy1-Depletionsstamm gebildeten Sporen im Gegensatz zu einem Kontrollstamm weniger klar vom Ascus abgegrenzt waren. Dieser Phänotyp wurde bereits vorher für Zellen mit hoher PKA-Aktivität beschrieben (McDonald *et al.*, 2009). Insgesamt zeigt dieses Experiment, dass eine Erhöhung der PKA-Aktivität früh nach Initiation der Meiose einen negativen Einfluss auf die Sporulation hat. Dies zeigte sich durch die verringerte Ime2-Menge und die hohe Zahl unsporulierter Zellen.

### 2.2.6 Erhöhung der PKA-Aktivität durch Expression der dominant-aktiven *RAS2<sup>G19V</sup>*-Variante

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg besteht in der Expression der dominant-aktiven *RAS2<sup>G19V</sup>*-Variante (Kataoka *et al.*, 1984; Pichova *et al.*, 1997; Toda *et al.*, 1985). Bei *RAS2<sup>G19V</sup>* handelt es sich um eine „*missense*“-Mutation, die dazu führt, dass Ras2 gebundenes GTP nicht mehr hydrolysieren kann, demzufolge also konstitutiv aktiv ist. Dies führt zu einer dauerhaften Aktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges (Marshall *et al.*, 1987).

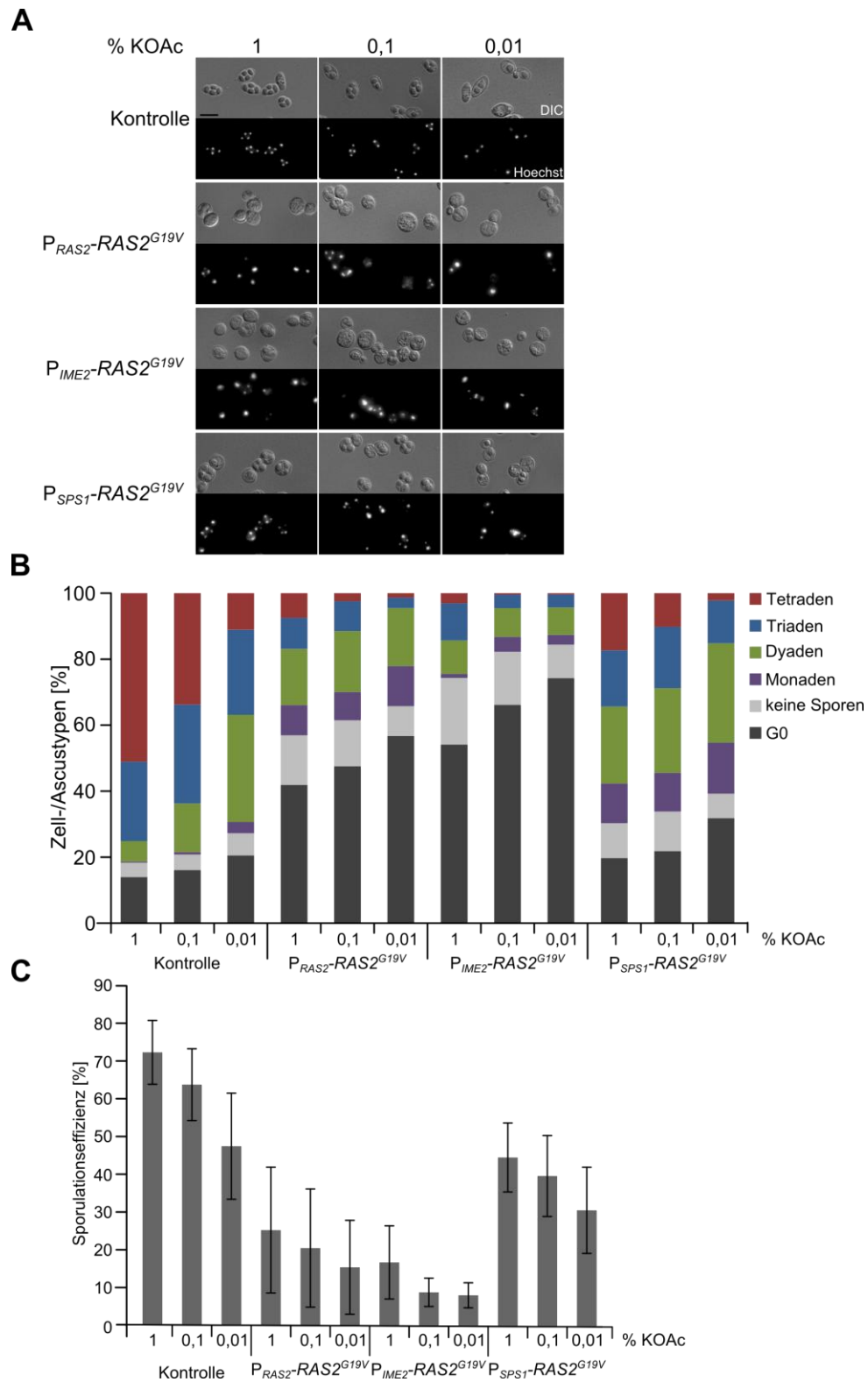
Es sollte überprüft werden, welche Auswirkungen die Expression von *RAS2<sup>G19V</sup>* in sporulierenden Zellen hat. Das *RAS2<sup>G19V</sup>*-Allel lag auf einem *CEN/ARS*-Plasmid<sup>3</sup> (B2255) vor und stand unter Kontrolle des *RAS2*-Promotors. Da bekannt war, dass die Expression von *RAS2<sup>G19V</sup>*, aufgrund der daraus folgenden hohen PKA-Aktivität den Eintritt in die Meiose erschwert (Marshall *et al.*, 1987), wurden neben dem *P<sub>RAS2</sub>-RAS2<sup>G19V</sup>*-Plasmid zwei weitere Plasmide hergestellt, in denen die Expression von *RAS2<sup>G19V</sup>* durch zwei Meiose-spezifische Promotoren, den *IME2*-Promotor (pMJ17)

<sup>3</sup>Ein zentromeres (*CEN*) Plasmid enthält einen Replikationsursprung (*ARS*) und ein *S. cerevisiae* Zentromer. Es verhält sich daher wie ein Chromosom und segregiert während der Mitose und Meiose. Es liegt in einfacher Kopie in der Zelle vor.



und den *SPSI*-Promotor (pMJ16) kontrolliert wurde. Durch die Meiose-spezifische Expression von *RAS2*<sup>G19V</sup> sollte verhindert werden, dass die Initiation der Meiose gestört wird. Da der *IME2*-Promotor früh, der *SPSI*-Promotor hingegen später in der Meiose, nach dem *commitment* aktiv ist, bot sich außerdem die Möglichkeit zu beobachten ob die Erhöhung der PKA-Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des meiotischen Zellzyklus unterschiedliche Auswirkungen auf die Sporulation hat. Die drei Plasmide, die entweder *P*<sub>RAS2</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup>, *P*<sub>IME2</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup>, oder *P*<sub>SPSI</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup> enthielten wurden je in einen Wildtyphefestamm transformiert. Anschließend wurde in den Stämmen Sporulation induziert und ausgewertet. Die Stämme mit *P*<sub>RAS2</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup> und *P*<sub>IME2</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup> sporulierten vergleichbar mit dem Bcy1-Depletionsstamm. In beiden Fällen sporulierten 40 und 70 % der Zellen nicht (Abbildung 15 A und B). Demzufolge war die Sporulationseffizienz verglichen mit dem Kontrollstamm bei allen Kaliumacetatkonzentrationen niedriger. Hier zeigt sich, wie auch schon im Fall der Bcy1-Depletion ein negativer Einfluss von früh in der Meiose erhöhter PKA-Aktivität. Der negative Einfluss von *P*<sub>RAS2</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup> auf die Sporulation wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Kataoka *et al.*, 1984). Hefezellen mit *P*<sub>SPSI</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup> verhielten sich hingegen anders. Insgesamt zeichnete sich die Mutante durch eine verringerte Sporenbildung aus, die sich aber nicht wie im Fall von *P*<sub>RAS2</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup> oder *P*<sub>SPSI</sub>-*RAS2*<sup>G19V</sup> durch einen starken Anstieg nicht sporulierter Zellen auszeichnete, sondern durch eine allgemeine Reduktion der Sporenzahl. Die Zahl der unsporulierten Zellen war insgesamt verringert, die am meisten vertretene Ascusspezies waren Dyaden (Abbildung 15 A und B). Dies führte zu einer im Vergleich zum Kontrollstamm verringerten Sporulationseffizienz (Abbildung 15 C).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Hyperaktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges auch nach der Initiation der Meiose noch einen negativen Einfluss auf die Sporulation und Sporenbildung hatte. Weiterhin zeigte sich, dass es einen großen Unterschied macht, zu welchem Zeitpunkt im meiotischen Zellzyklus die PKA-Aktivität erhöht wurde. Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass die Veränderung der Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges sowohl früh (*P*<sub>IME2</sub>) als auch spät in der Meiose (*P*<sub>SPSI</sub>) zu phänotypischen Konsequenzen führt. Dies zeigt, dass der Signaltransduktionsweg grundsätzlich in der Lage ist, Prozesse während der Sporulation zu regulieren. Insgesamt stehen die Ergebnisse im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mittels Ras-Depletion erhalten wurden. Die Depletion von Ras



**Abbildung 15: Auswirkungen der Expression von  $RAS2^{G19V}$  unter Kontrolle des  $RAS2$ -,  $IME2$ - oder  $SPS1$ -Promotors auf die Sporulation**

A) Die *CEN*-Plasmide B2255 ( $P_{RAS2}$ - $RAS2^{G19V}$ ), pMJ17 ( $P_{IME2}$ - $RAS2^{G19V}$ ), oder pMJ18 ( $P_{SPS1}$ - $RAS2^{G19V}$ ) wurden in den Stamm YKS32 transformiert. Als Kontrolle diente der Stamm YKS32 mit einem Leervektor (pRS316). Die Sporulation erfolgte, wie in Abbildung 10 A beschrieben. Für jedes Experiment wurden die Plasmide erneut in den Stamm YKS32 transformiert. DIC: differentieller Interferenz Kontrast, Hoechst: DNA Färbung mittels Hoechst 33342. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu$ m. B) Quantifizierung der nach der Sporulation entstandenen Zell- und Ascustypen. Durchführung wie in Abbildung 10 C beschrieben. C) Bestimmung der Sporulationseffizienz der Stämme aus dem in B) beschriebenen Experiment. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben.

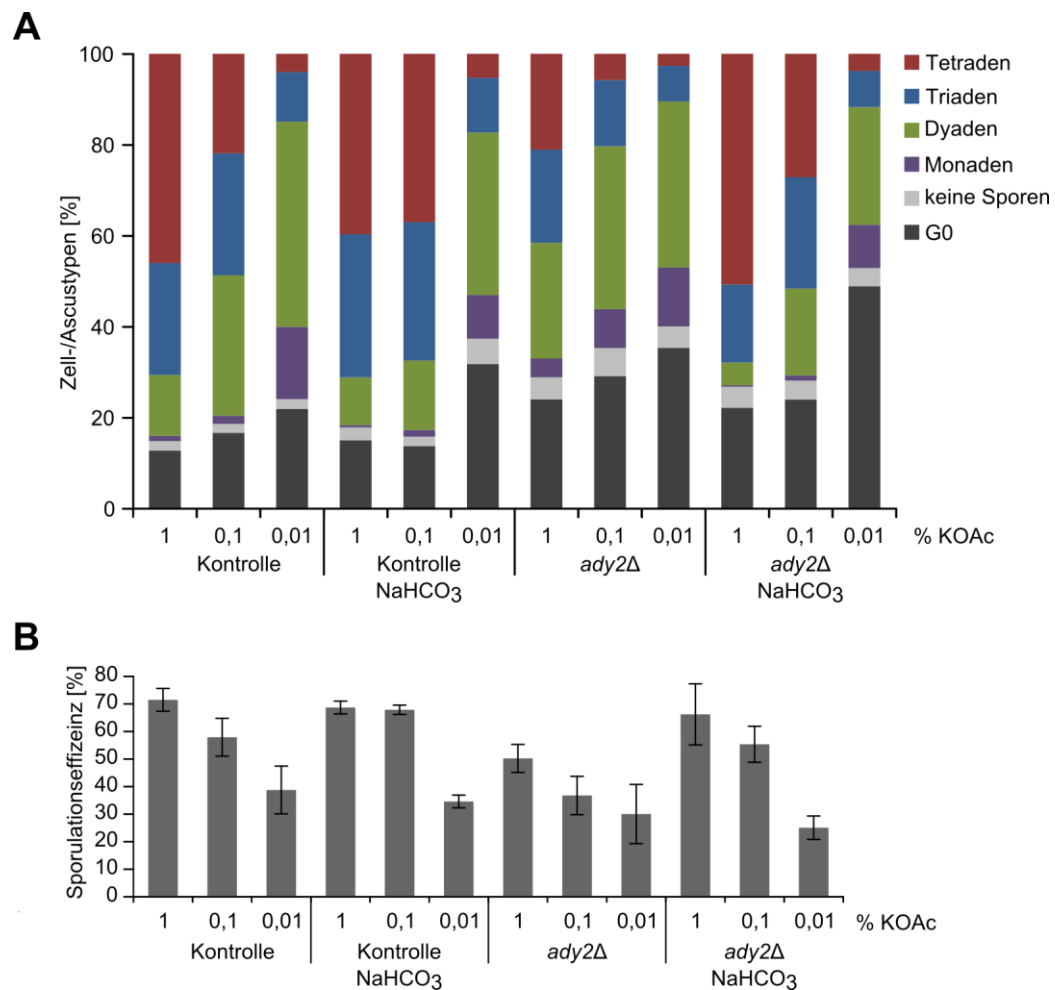
fürte zu einer allgemeinen Erhöhung der Sporenzahl in der Kultur, während die Erhöhung der PKA-Aktivität durch Expression von *RAS2<sup>G19V</sup>* zu einer allgemeinen Verringerung der Sporenzahl führte. Die Ergebnisse decken sich demnach mit der Erwartung, dass eine Verringerung, im Vergleich zu einer Erhöhung der PKA-Aktivität einen gegenteiligen Phänotyp hervorruft.

### 2.3 Einfluss der Regulation von Cyr1 durch Bicarbonat auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle

Da Bicarbonat die Sporulation positiv beeinflusst und die Aktivität vieler Adenylzyklen der Klasse III durch Bicarbonat beeinflusst wird, lag der Schluss nahe, dass diese Verbindung für die Regulation der Sporenzahl in *S. cerevisiae* eine Rolle spielen könnte. Um dies zu überprüfen, sollte die Sporulation von Wildtypstämmen und Stämmen, in denen die Sporenzahlkontrolle gestört ist in An- und Abwesenheit von Bicarbonat untersucht werden. Die *ady1Δ*- und die *ady2Δ*-Mutanten produzieren aufgrund gestörter Sporenzahlkontrolle überwiegend Dyaden (Deng and Saunders, 2001; Taxis *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde eine Mutante ausgewählt, in der die drei Gene *MPC54*, *MPC70* und *SPO74*, die für Proteine der meiotischen Platte kodieren, heterozygot deletiert wurden. Auch diese Mutante produziert überwiegend Dyaden (Taxis *et al.*, 2005).

Um die Sporulation der Mutanten in An- und Abwesenheit von Bicarbonat zu überprüfen, wurde eine Methode verwendet, die eine Erhöhung der CO<sub>2</sub> Konzentration in der Luft zur Folge hat. In typischen physiologischen Lösungen, also auch in Zellen, ist CO<sub>2</sub> im Gleichgewicht mit Bicarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und H<sup>+</sup> (CO<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O ⇌ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>+H<sup>+</sup>), letztlich bedeutet eine Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration also eine Erhöhung der HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration. Bei der Überprüfung der Sporulation der Mutanten und des Kontrollstamms in normaler und CO<sub>2</sub> angereicherter Luft, zeigte sich, dass der Kontrollstamm bei mittleren Kaliumacetatkonzentrationen (0,1 %) in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft besser sporulierte als in normaler Luft. Dies zeigte sich durch eine erhöhte Bildung von Tetraden (Abbildung 16 A) und einer daraus resultierenden höheren Sporulationseffizienz in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft (Abbildung 16 B). Die Sporulation der *ady2Δ*-Mutante in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft führte zu einer fast vollständigen Supprimierung des *ady2Δ*-Phänotyps. Besonders deutlich wurde dies bei Betrachtung der Anzahl an Tetraden und Dyaden. Bei 1 % und 0,1 % Kaliumacetat

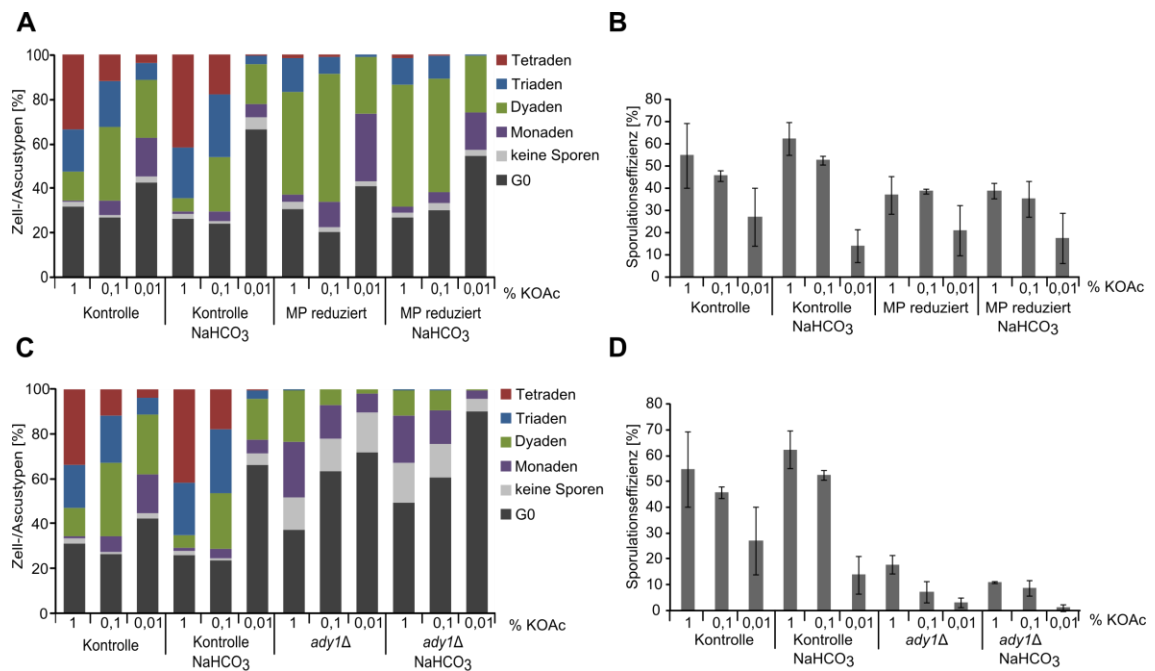
wurde in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft eine Zunahme der Anzahl an Tetraden und eine Abnahme der Anzahl an Dyaden beobachtet (Abbildung 16 A). Lediglich bei 0,01 % Kaliumacetat war die Zahl der unsporulierten Zellen in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft höher, als in normaler Luft. Die Sporulationseffizienz war bei 1 % und 0,1 % Kaliumacetat in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft höher, als in normaler Luft (Abbildung 16 B).



**Abbildung 16: Einfluss von Hydrogencarbonat auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle**

**A)** Quantifizierung der nach der Sporulation in normaler oder CO<sub>2</sub> angereicherter Luft (NaHCO<sub>3</sub>), entstandenen Zell- und Ascustypen eines Kontrollstamms (YKS32) und einer *ady2Δ*-Mutante (YMJ69). Die Sporulation erfolgte auf SPO-Agarplatten mit 1 %, 0,1 % oder 0,01 % KOAc in CO<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre, die durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat in den Deckel der SPO-Platte hergestellt wurde. **B)** Sporulationseffizienz von Kontrollstämmen und *ady2Δ*-Mutanten. Die Sporulationseffizienz wurde anhand der Daten aus A berechnet.

Sowohl in der *ady1Δ*-Mutante, als auch in der Mutante mit reduzierter Menge an MP-Proteinen, führte die Sporulation in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft zu keiner Änderung im Sporulationsverhalten (Abbildung 17 A-D). Zellen in denen die Gene *MPC54*, *MPC70* und *SPO74* heterozygot deletiert waren, produzierten aufgrund geringerer Mengen an MP-Proteinen überwiegend Dyaden und so gut wie keine Tetraden. Die Sporulation dieses Stammes in CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre hatte auf dieses



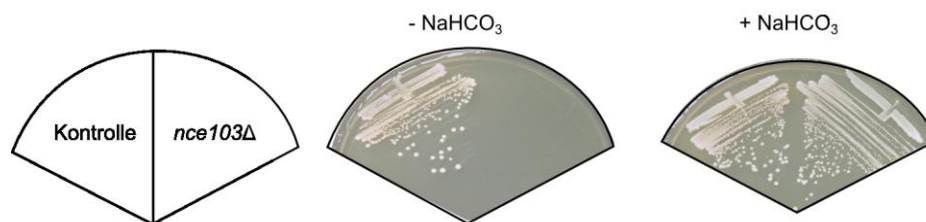
**Abbildung 17: Einfluss von Bicarbonat auf die Sporulation einer *ady1Δ*-Mutante und einer Mutante mit reduzierten MP-Proteinmengen**

**A)** Quantifizierung der nach der Sporulation in normaler oder CO<sub>2</sub> angereicherter Luft (NaHCO<sub>3</sub>), entstandenen Zell- und Ascustypen eines Kontrollstamms (YKS32) und einer Mutante, in der die MP-Proteinlevel durch heterozygote Deletion von *MPC54*, *MPC70* und *SPO74* reduziert wurden (MP reduziert; YCT775). Durchführung wie in Abbildung 16 A beschrieben. **B)** Sporulationseffizienz, die aus den in A) gezeigten Daten resultiert. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben. **C)** Quantifizierung der nach der Sporulation in normaler oder CO<sub>2</sub> angereicherter Luft (NaHCO<sub>3</sub>), entstandenen Zell- und Ascustypen eines Kontrollstamms (YKS32) und einer *ady1Δ*-Mutante (YMJ68). Durchführung wie in Abbildung 16 A beschrieben. **D)** Sporulationseffizienz, die aus den in C) gezeigten Daten resultiert. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben.

Sporulationsverhalten keinen Einfluss (Abbildung 17 A und B). Ein ähnliches Verhalten wurde für die *ady1Δ*-Mutante gefunden, sie produzierte in normaler Luft und in CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre überwiegend Dyaden, Monaden und unsporulierte Zellen (Abbildung 17 B und C). Diese Ergebnisse zeigen, dass Bicarbonat an der Regulation der Sporenzahlkontrolle beteiligt ist und dass innerhalb eines Signaltransduktionsweges Ady2 oberhalb, Ady1 und die Bildung der meiotischen Platte hingegen unterhalb der Bicarbonat-abhängigen Regulation einzuordnen ist. Die Zugabe von Bicarbonat zu sporulierenden Zellen führte, wie auch schon die Depletion von Ras oder Tpk zu einer allgemeinen Erhöhung der Sporenzahl, was den Schluss zulässt, dass Bicarbonat einen negativen Einfluss auf Cyr1 ausübt. Überraschenderweise führte die CO<sub>2</sub> angereicherte Atmosphäre nicht zu einer Erhöhung der Sporenzahl bei niedrigen Acetatkonzentrationen. Denkbar ist, dass Kaliumacetat ein weiteres Signal erzeugt, das zur Bildung hoher Sporenzahlen benötigt wird.

### 2.3.1 Einfluss der Carbonanhydrase Nce103 auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle

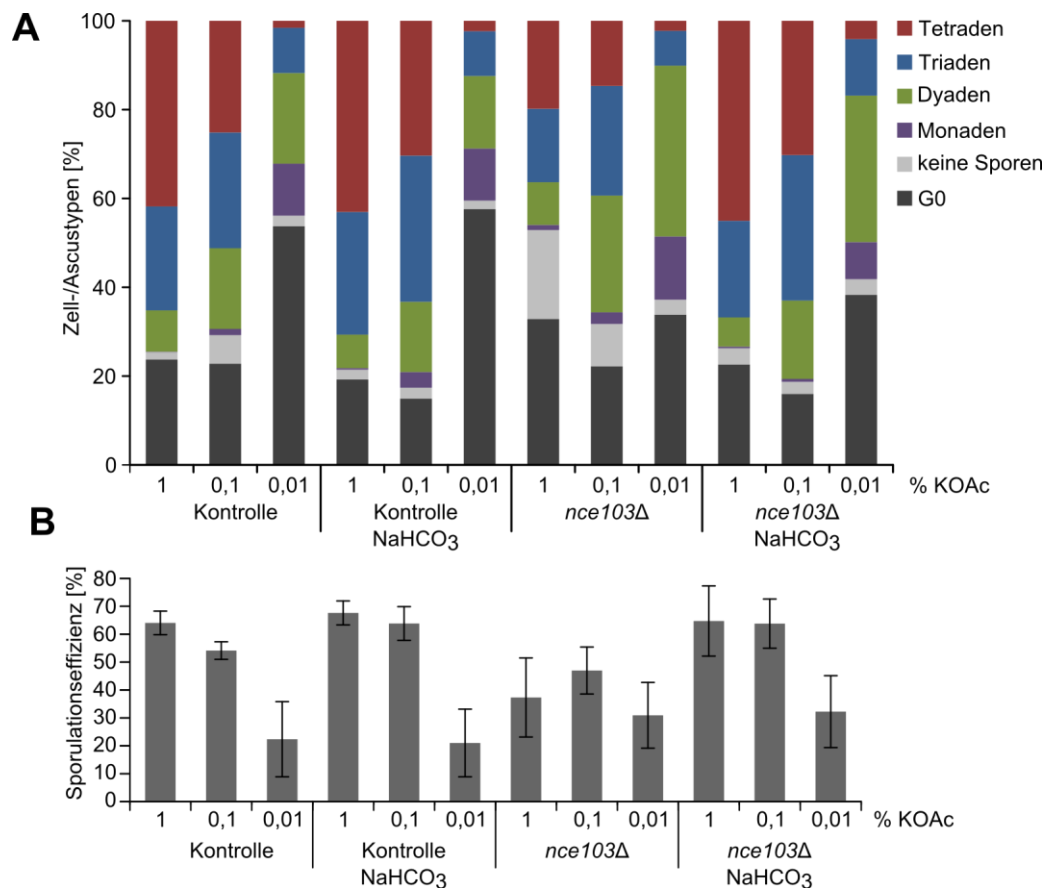
Wie bereits beschrieben befindet sich  $\text{CO}_2$  in wässriger Lösung mit  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{H}^+$  im Gleichgewicht. In den meisten Zellen wird die Reaktion  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  durch sogenannte Carbonanhydrasen beschleunigt, so dass sich das Gleichgewicht schneller einstellt. In *S. cerevisiae* wurde eine Carbonanhydrase identifiziert, das Protein Nce103. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Deletion von *NCE103* zu einem Wachstumsdefekt führt, der in  $\text{CO}_2$  angereicherter Atmosphäre supprimiert wird (Gotz *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob die intrazelluläre Bildung von Bicarbonat einen Einfluss auf die Sporezahlkontrolle hat, wurde das Gen *NCE103* deletiert (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Die Deletion von *NCE103* führt zu einem Wachstumsdefekt bei Wachstum in normaler Luft**

Ein Kontrollstamm (YKS32) und die *nce103Δ*-Mutante (YMJ132) wurden auf YPD-Platten ausgestrichen und in normaler Luft (-  $\text{NaHCO}_3$ ) oder  $\text{CO}_2$  angereicherter Atmosphäre (+  $\text{NaHCO}_3$ ) für zwei Tage bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die Überprüfung der Sporulation der *nce103Δ*-Mutante zeigte, dass der Stamm einen Sporulationsdefekt hatte, wenn er in normaler Luft sporulierte. Der Sporulationsdefekt ähnelte dabei dem der *ady2Δ*-Mutante, da die Regulation der Sporezahl gestört, die Zahl der Sporen pro Ascus reduziert war und viele Zellen nicht sporulierten. Dieser Sporulationsdefekt der *nce103Δ*-Mutante war nicht beobachtbar, wenn die Mutante in  $\text{CO}_2$  angereicherter Atmosphäre sporulierte (Abbildung 19 A und B). Dies zeigt, dass die intrazelluläre Umwandlung von  $\text{CO}_2$  zu Bicarbonat wichtig ist, um eine optimale Sporulation zu gewährleisten und die Sporezahl zu regulieren. Weiterhin zeigt das Experiment, dass Nce103 zwar, wie bereits in der Literatur beschrieben für das vegetative Wachstum essentiell ist (Gotz *et al.*, 1999), Sporulation hingegen grundsätzlich auch ohne Nce103 möglich ist, wenn auch mit geringerer Effizienz.



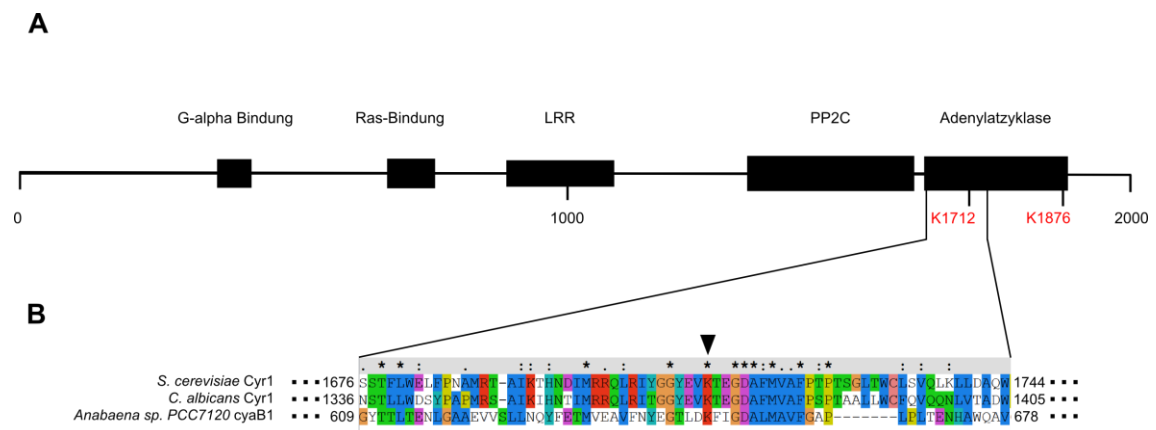
**Abbildung 19: Auswirkungen der Deletion von *NCE103* auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle**

**A)** Quantifizierung der nach der Sporulation in normaler oder CO<sub>2</sub> angereicherter Luft (NaHCO<sub>3</sub>), entstandenen Zell- und Ascustypen eines Kontrollstammes (YKS32) und einer *nce103Δ*-Mutante (YMJ132). Durchführung wie in Abbildung 16 A beschrieben. **B)** Sporulationseffizienz eines Kontrollstammes und der *nce103Δ*-Mutante. Die Sporulationseffizienz wurde anhand der in A gezeigten Daten berechnet. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben.

### 2.3.2 Einfluss von *cyr1*-Mutationen auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle

Die nächste Frage, die sich stellte war, ob der Einfluss von Bicarbonat auf die Sporulation und Sporenzahlkontrolle durch die Adenylylzyklase *Cyr1* vermittelt wurde. Aus der Literatur war bekannt, dass in der Adenylylzyklase *cyaB1* aus dem Cyanobakterium *Anabaena sp.* PCC7120 und Adenylylzyklasen aus Säugetieren ein Lysin im aktiven Zentrum der Adenylylzyklase mitverantwortlich für die Koordination des Bicarbonations ist (Cann *et al.*, 2003). Auch die Adenylylzyklase aus *C. albicans* enthält im aktiven Zentrum ein Lysin (Hall *et al.*, 2010). Cokristallisationsstudien haben ergeben, dass das Bicarbonation zu einer Konformationsänderung im aktiven Zentrum der Adenylylzyklase *CyaC1* aus dem Cyanobakterium *Spirulina platensis* führt. Diese Konformationsänderung führt zur Rekrutierung eines zweiten katalytischen Ions in das aktive Zentrum und damit zu einer Steigerung der Enzymaktivität von *CyaC1* (Stegborn *et al.*, 2005).

Um herauszufinden, ob ein Lysin an entsprechender Stelle auch in Cyr1 aus *S. cerevisiae* vorhanden ist, wurden die Proteinsequenzen von *cyaB1* aus *Anabaena sp.* PCC7120, Cyr1 aus *S. cerevisiae* und Cyr1 aus *C. albicans* unter Verwendung des Programms ClustalX verglichen (Jeanmougin *et al.*, 1998). So zeigte sich, dass auch im aktiven Zentrum von Cyr1 aus *S. cerevisiae* an analoger Stelle ein Lysin vorhanden ist (K1712; Abbildung 20).



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Cyr1 aus *S. cerevisiae* und partieller Sequenzvergleich der Adenylylzyklasen aus *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *Anabaena sp.***

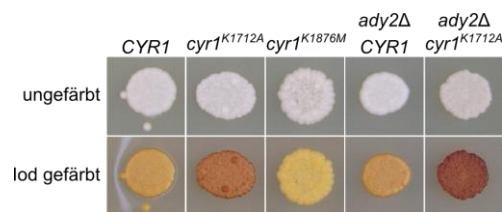
**A)** Schematische Darstellung der Proteindomänen von Cyr1 aus *S. cerevisiae*. G-alpha Bindung: Bereich in dem Gpa2 bindet. Ras-Bindung: Bereich in dem Ras1 und Ras2 binden. LRR: Leucin-reiche Region. PP2C: Proteinphosphatase 2C-ähnliche Domäne. Adenylylzyklase: aktives Zentrum von Cyr1. K1712: Lysin an Position 1712, das für die Koordination des Bicarbonations zuständig sein könnte. K1876: Lysin an Position 1876; wurde in dieser Arbeit durch ein Methionin ersetzt. Maßstab in Aminosäuren. **B)** Sequenzvergleich (Alignment) der Adenylylzyklasen von *S. cerevisiae*, *C. albicans* und *Anabaena sp.* Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalX erstellt. Bedeutung der Symbole: Stern (\*) = Spalte des Sequenzvergleichs enthält identische Aminosäuren in allen Sequenzen. Doppelpunkt (:) = Spalte des Sequenzvergleichs enthält unterschiedliche, aber hoch konservierte (sehr ähnliche) Aminosäuren. Punkt (.) = Spalte des Sequenzvergleichs enthält unterschiedliche, aber ähnliche Aminosäuren. Das Dreieck markiert das Lysin an Position 1712 von *S. cerevisiae*, beziehungsweise das analoge Lysin in Cyr1 aus *C. albicans*, beziehungsweise *cyaB1* aus *Anabaena sp.*.

Es bestand demnach die Vermutung, dass auch Cyr1 aus *S. cerevisiae* durch Bicarbonat beeinflusst werden könnte. Durch *in vitro* Experimente wurde gezeigt, dass ein Austausch des Lysins an Stelle 646 von *cyaB1* aus *Anabaena sp.* PCC7120 durch ein Alanin dazu führt, dass die Adenylylzyklase nicht mehr durch Bicarbonat aktiviert werden kann. Allerdings verliert *cyaB1* dadurch auch 95 % der Adenylylzyklase-Aktivität (Cann *et al.*, 2003). Eine weitere Mutation in *CYR1* (*cyr1*<sup>K1876M</sup>) führt dazu, dass nur basale cAMP-Mengen produziert werden und die cAMP-Konzentration nach Zugabe von Glukose nicht erhöht wird (Vanhalewyn *et al.*, 1999). Es sollte überprüft werden welchen Einfluss die *cyr1*<sup>K1712A</sup>- und die *cyr1*<sup>K1876M</sup>-Mutation auf die Sporulation eines Kontrollstammes und einer *ady2Δ*-Mutante haben.

In einem ersten Schritt sollte untersucht werden, ob die PKA-Aktivität in den Mutanten im Vergleich zu einem Kontrollstamm verändert ist. Eine einfache Methode, die



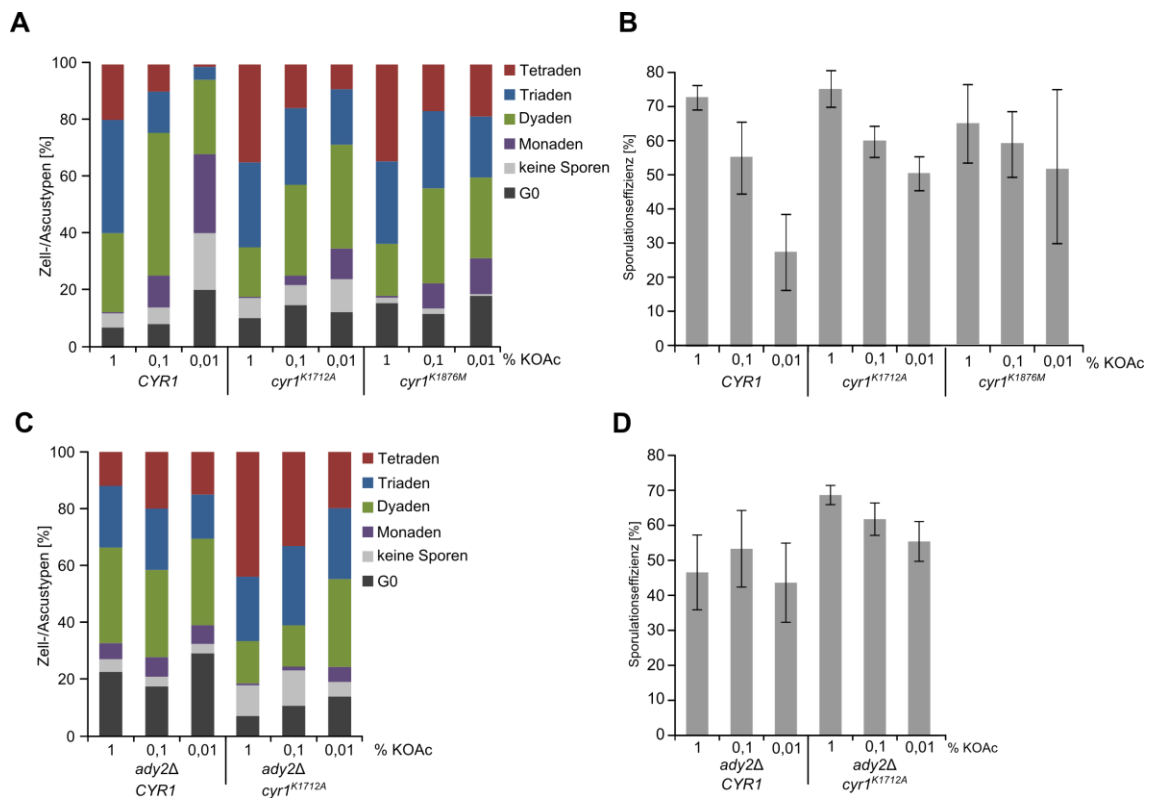
Rückschlüsse auf die PKA-Aktivität erlaubt, ist die Färbung von Hefezellen über Joddämpfen. Ein Merkmal niedriger PKA-Aktivität ist die Einlagerung von Speicherkohlenhydraten wie Glykogen (van der Plaats, 1974), dies führt zu einer Dunkelfärbung der Zellen über Joddämpfen. Bei hoher PKA-Aktivität wird hingegen kein Glykogen gespeichert, die Zellen bleiben hell oder werden leicht gelblich gefärbt. Die Jodfärbung der *cyr1*- und *ady2Δ* *cyr1*-Mutanten zeigte, dass *cyr1*<sup>K1712A</sup>- und *ady2Δ* *cyr1*<sup>K1712A</sup>-Mutanten über Joddämpfen eine wesentlich dunklere Farbe annahmen, als Vergleichsstämme. Dies deutet darauf hin, dass die *cyr1*<sup>K1712A</sup>-Mutation auch in *S. cerevisiae* zu einem Aktivitätsverlust von *CYR1* und damit zu geringer PKA-Aktivität führt. Die *cyr1*<sup>K1876M</sup>-Mutation hatte keinen erheblichen Einfluss auf die PKA-Aktivität, die Färbung der Zellen war etwas heller, als die des Kontrollstamms (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Färbung von *cyr1*- und *ady2Δ* *cyr1*-Mutanten über Joddämpfen**

Folgende Hefestämme wurden verwendet: *CYR1* (YMJ147), *cyr1*<sup>K1712A</sup> (YMJ151), *cyr1*<sup>K1876M</sup> (YMJ215), *ady2Δ* *CYR1* (YMJ184), *ady2Δ* *cyr1*<sup>K1712A</sup> (YMJ181). Die Zellen wurden vor und nach der Färbung über Joddämpfen fotografiert.

Als nächstes wurde die Sporulation der Mutanten in normaler Luft überprüft. Die *CYR1*-Wildtypkontrolle (*CYR1*) sporulierte wie erwartet, die Zahl der Tetraden und Triaden nahm mit abnehmender Kaliumacetatkonzentration ab, die Zahl der Dyaden und Monaden hingegen zu (Abbildung 22 A). Die Sporulationseffizienz verringerte sich mit sinkender Kaliumacetatkonzentration, dies zeigte, dass die Sporenzahl reguliert wurde (Abbildung 22 B). Die *cyr1*<sup>K1712A</sup>-Mutante verhielt sich anders. Zunächst fiel auf, dass die Mutanten auch bei geringen Kaliumacetatkonzentrationen im Gegensatz zur korrespondierenden Wildtypkontrolle (*CYR1*) noch viele Tetraden produzierten. Des Weiteren änderte sich die Zahl der Triaden, Dyaden und Monaden nicht so stark, wie im Vergleichsstamm (Abbildung 22 A). Aus diesem Sporulationsverhalten resultierte eine, sich bei verschiedenen Kaliumacetatkonzentrationen kaum ändernde Sporulationseffizienz (Abbildung 22 B), was ein Indiz für eine gestörte Sporenzahlkontrolle ist. Der gleiche Phänotyp wurde für die *cyr1*<sup>K1876M</sup>-Mutante beobachtet. Die *ady2Δ* *CYR1*-Mutante sporulierte in etwa wie erwartet. Sie produzierte bei allen Kaliumacetatkonzentrationen eine hohe Anzahl an Dyaden (Abbildung 22 C), die Sporulationseffizienz änderte sich kaum (Abbildung 22 D). Überraschenderweise führte die *cyr1*<sup>K1712A</sup>-Mutation in der *ady2Δ*-Mutante zu einem Verlust des



**Abbildung 22: Der Einfluss der *cyrI<sup>K1712A</sup>*- und der *cyrI<sup>K1876M</sup>*-Mutation auf die Sporulation**

**A**) Quantifizierung der nach der Sporulation entstandenen Zell- und Ascustypen eines *CYR1*-Wildtypstamms (YMJ147), einer *cyrI<sup>K1712A</sup>*-Mutante (YMJ151) und einer *cyrI<sup>K1876M</sup>*-Mutante. Durchführung wie in Abbildung 10 C beschrieben. **B**) Sporulationseffizienz der Stämme aus A. Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben. **C**) Quantifizierung der nach der Sporulation entstandenen Zell- und Ascustypen einer *ady2Δ CYR1*-Mutante (YMJ184) und einer *ady2Δ cyrI<sup>K1712A</sup>*-Mutante (YMJ184). Durchführung wie in Abbildung 10 C beschrieben. **D**) Sporulationseffizienz der Stämme aus B). Durchführung wie in Abbildung 10 D beschrieben.

*ady2Δ*-Phänotyps. Die Zahl der Tetraden war stark erhöht, die Zahl der Dyaden leicht verringert (Abbildung 22 C). Ein vergleichbares Ergebnis wurde bereits bei der Zugabe von Bicarbonat zu einer *ady2Δ*-Mutante beobachtet (Abbildung 16). Die *ady2Δ cyrI<sup>K1712A</sup>*-Mutante sporulierte nicht vergleichbar mit dem *CYR1*-Kontrollstamm, sondern zeigte ein mit der *cyrI<sup>K1712A</sup>*-Mutante vergleichbares Sporulationsverhalten (Abbildung 22 B und D). Da anscheinend bereits die Anwesenheit der *cyrI<sup>K1712A</sup>*-Mutation zu einer Störung der Regulation der Sporenzahl führt, wurde die Sporulation in CO<sub>2</sub> angereicherter Luft für die Mutanten nicht untersucht, da man nicht sicher wäre ob beobachtete Effekte durch Bicarbonat oder die *cyrI<sup>K1712A</sup>*-Mutation hervorgerufen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die *cyrI<sup>K1712A</sup>*- und die *cyrI<sup>K1876M</sup>*-Mutation zu einer Störung der Sporenzahlkontrolle führen und dass der *ady2Δ*-Phänotyp durch die *cyrI<sup>K1712A</sup>*-Mutation supprimiert wird. Durch dieses Ergebnis lässt sich schließen, dass Ady2 in der Sporenzahlkontrolle oberhalb von Cyr1 einzuordnen ist. Wichtig ist der

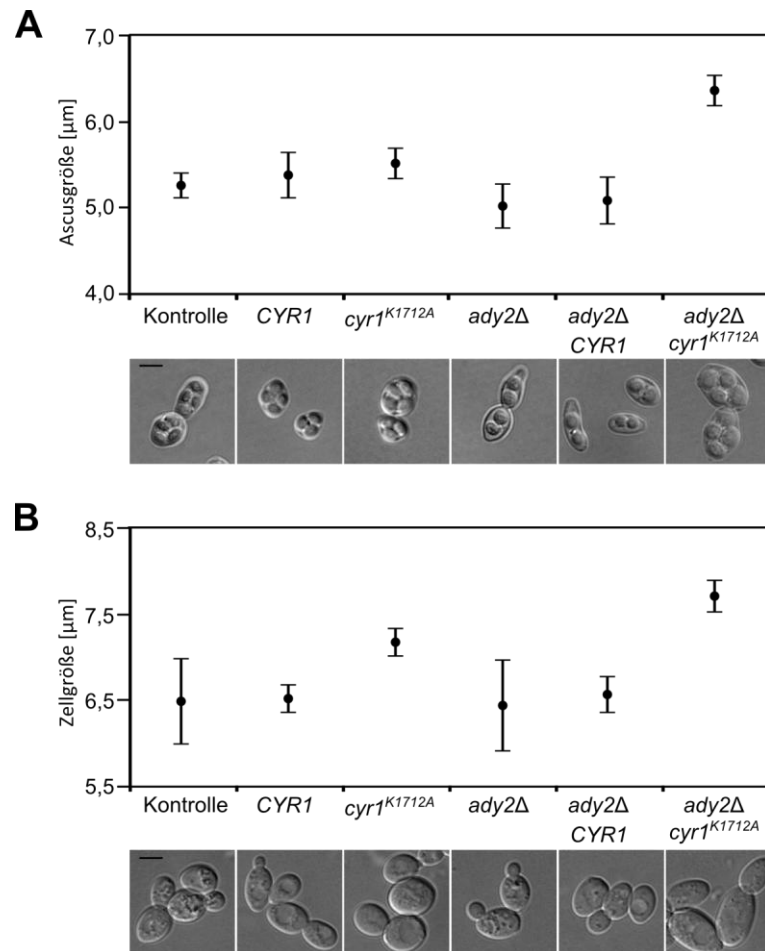
Unterschied zwischen den beiden *cyrI*-Mutanten. Die *cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutation führt zu einer geringeren PKA-Aktivität, die *cyrI*<sup>K1876M</sup>-Mutation hingegen dazu, dass die cAMP-Menge basal bleibt und die PKA-Aktivität aufgrund dessen nicht mehr moduliert werden kann. Dies zeigt, dass neben einer bestimmten Stärke auch die Modulation der PKA-Aktivität für die Sporezahlkontrolle wichtig ist.

### 2.3.3 Einfluss des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges auf die Zell- und Ascusgröße

Bei der Überprüfung der Sporulation der *cyrI*- und *ady2Δ cyrI*-Mutanten fiel auf, dass Asci und Sporen von *cyrI*<sup>K1712A</sup>- und *ady2Δ cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutanten verglichen mit Vergleichsstämmen größer waren. Daher wurde die Zellgröße der Mutanten während des vegetativen Wachstums und während der Sporulation untersucht. Die *cyrI*<sup>K1876M</sup>-Mutante wurde nicht untersucht, da sie keine Auffälligkeiten in der Zellgröße aufwies und in ihr auch keine nennenswerten Unterschiede in der Färbung über Joddämpfen zu erkennen waren (Abbildung 21).

Die Messung der Zellgröße erfolgte unter Verwendung des Beckman Multisizer™ 3 Coulter Counter®. Dieses Gerät ermöglicht die Bestimmung von Zellgrößen, wobei die Messung auf dem Prinzip der digitalen Impedanzmessung beruht<sup>4</sup>. Mit Hilfe des Coulter Counter® ist es möglich in kurzer Zeit die Zellgröße einer sehr großen Anzahl von Zellen zu bestimmen. Die Messungen zeigten, dass *cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutanten im Durchschnitt 1 µm größer waren, als Vergleichsstämme. Dies galt sowohl für vegetativ wachsende, als auch für sporulierte Zellen. Im Durchschnitt waren die Asci der *ady2Δ*-Mutante und die der *ady2Δ CYRI*-Mutante etwas kleiner. Dies liegt darin begründet, dass beide Mutanten viele Dyaden produzieren, die einen kleineren Durchmesser als Tetraden haben. Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch die *cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutation verursachte Verringerung der PKA-Aktivität oder die vermutlich fehlende Sensitivität gegenüber Bicarbonat einen Einfluss auf die Zellgröße während des vegetativen Wachstums und die Größe der Sporen und Asci nach der Sporulation hat.

<sup>4</sup><https://www.beckmancoulter.com>



**Abbildung 23: Bestimmung der Ascusgröße nach der Sporulation und der Zellgröße während des vegetativen Wachstums von *cyr1*- und *ady2Δ cyr1*-Mutanten**

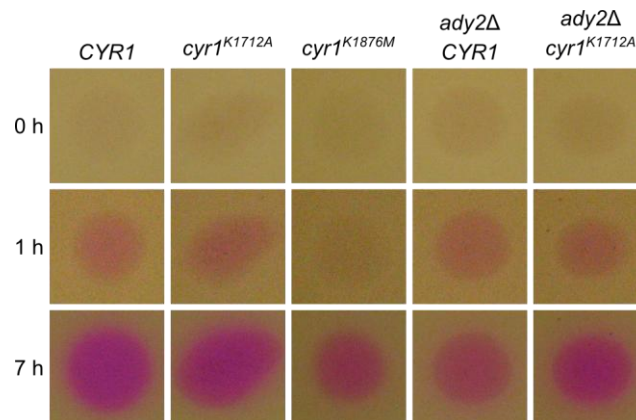
A) Bestimmung der Ascusgröße von *cyr1*- und *ady2Δ cyr1*-Mutanten nach der Sporulation mittels Beckman Multisizer™ 3 Coulter Counter® Messung. Folgende Hefestämmen wurden für die Messung verwendet: Kontrolle (YKS32), *CYR1* (YMJ147), *cyr1*<sup>K1712A</sup> (YMJ151), *cyr1*<sup>K1876A</sup> (YMJ215), *ady2Δ* (YMJ69), *ady2Δ CYR1* (YMJ184), *ady2Δ cyr1*<sup>K1712A</sup> (YMJ181). Die mikroskopischen Aufnahmen (DIC) unterhalb des Diagramms zeigen exemplarisch die verschiedenen Mutanten. Der Größenmaßstab beträgt 4 µm. B) Bestimmung der Zellgröße von *cyr1*- und *ady2Δ cyr1*-Mutanten während des vegetativen Wachstums mittels Beckman Multisizer™ 3 Coulter Counter® Messung. Es wurden die in A) angegebenen Hefestämmen verwendet. Die mikroskopischen Aufnahmen (DIC) unterhalb des Diagramms zeigen exemplarisch die verschiedenen Mutanten. Der Größenmaßstab beträgt 4 µm.

### 2.3.4 Einfluss des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges auf den Acetatstoffwechsel

In Sporulationsmedium mit Kaliumacetat als einziger Kohlenstoffquelle wechselt *S. cerevisiae* von einem fermentativen hin zu einem respiratorischen Stoffwechsel (Esposito *et al.*, 1969). Bei der Verstoffwechslung von Acetat entsteht CO<sub>2</sub>, das im umgebenden Medium vorwiegend in seiner hydratisierten Form als Bicarbonation (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) akkumuliert (Fowell, 1969). Eine Alkalisierung des Mediums findet statt, da Acetat in Form von Essigsäure aufgenommen wird, dies führt zu einer Reduktion der H<sup>+</sup>-Ionen im umgebenden Medium (Dickinson *et al.*, 1983; Mollapour and Piper, 2007). Die Alkalisierung des Mediums wird als sporulationsfördernd beschrieben (Hayashi *et al.*, 1998a, b; Ohkuni *et al.*, 1998; Piccirillo *et al.*, 2010). Um zu überprüfen ob die

beobachteten Sporulationsdefekte in *cyrI<sup>K1712A</sup>*- und *cyrI<sup>K1876M</sup>*-Mutanten auf eine Störung im Acetatstoffwechsel oder in der Aufnahme von Acetat zurückzuführen sind, wurden die Mutanten auf SPO-Platten mit dem pH-Indikator Phenolrot sporuliert. Phenolrot färbt sich in einem pH-Bereich von 7-8 zunehmend von gelb nach rot. Auf diese Weise ließ sich erkennen, wann und wie stark die einzelnen Mutanten das umgebende Medium alkalisierten.

Dabei stellte sich heraus, dass mit Ausnahme der *cyrI<sup>K1876M</sup>*-Mutante, alle Stämme bereits nach einer Stunde auf den Sporulationsplatten eine deutliche Rotfärbung hervorriefen, also das Medium alkalisierten. Die Rotfärbung nahm mit der Zeit weiter zu und erreichte nach 7 h ihr Maximum. Die schwächste Rotfärbung wurde nach 7 h von der *ady2Δ CYRI*-Mutante hervorgerufen (Abbildung 24). Eine ebenfalls, im



**Abbildung 24: Überprüfung der Alkalisierung des Sporulationsmediums**

Um die Alkalisierung des Mediums zu überprüfen wurde eine gleiche Zellmenge jeder Mutante auf SPO-Platten mit dem pH-Indikator Phenolrot getropft. Phenolrot färbt sich im pH-Bereich von 7-8 zunehmend von gelb nach rot. Folgende Hefestämme wurden verwendet: *CYRI* (YMJ147), *cyrI<sup>K1712A</sup>* (YMJ151), *cyrI<sup>K1876M</sup>* (YMJ215), *ady2Δ CYRI* (YMJ184), *ady2Δ cyrI<sup>K1712A</sup>* (YMJ181). Die Platten wurden direkt nach dem Auftropfen der Zellen (0 h), nach 1 h und nach 7 h fotografiert.

Vergleich zum Kontrollstamm geringere Rotfärbung des Mediums wurde durch die *cyrI<sup>K1876M</sup>*-Mutante hervorgerufen.

Dieses Experiment zeigt, dass die beobachteten Sporulationsphänotypen der *cyrI<sup>K1712A</sup>*- und der *cyrI<sup>K1876M</sup>*-Mutante nicht auf Defekte im Acetatstoffwechsel zurückzuführen sind. Obwohl die Mutanten Unterschiede in der Alkalisierung des Mediums zeigten, wiesen sie identisches Sporulationsverhalten auf (Abbildung 22).

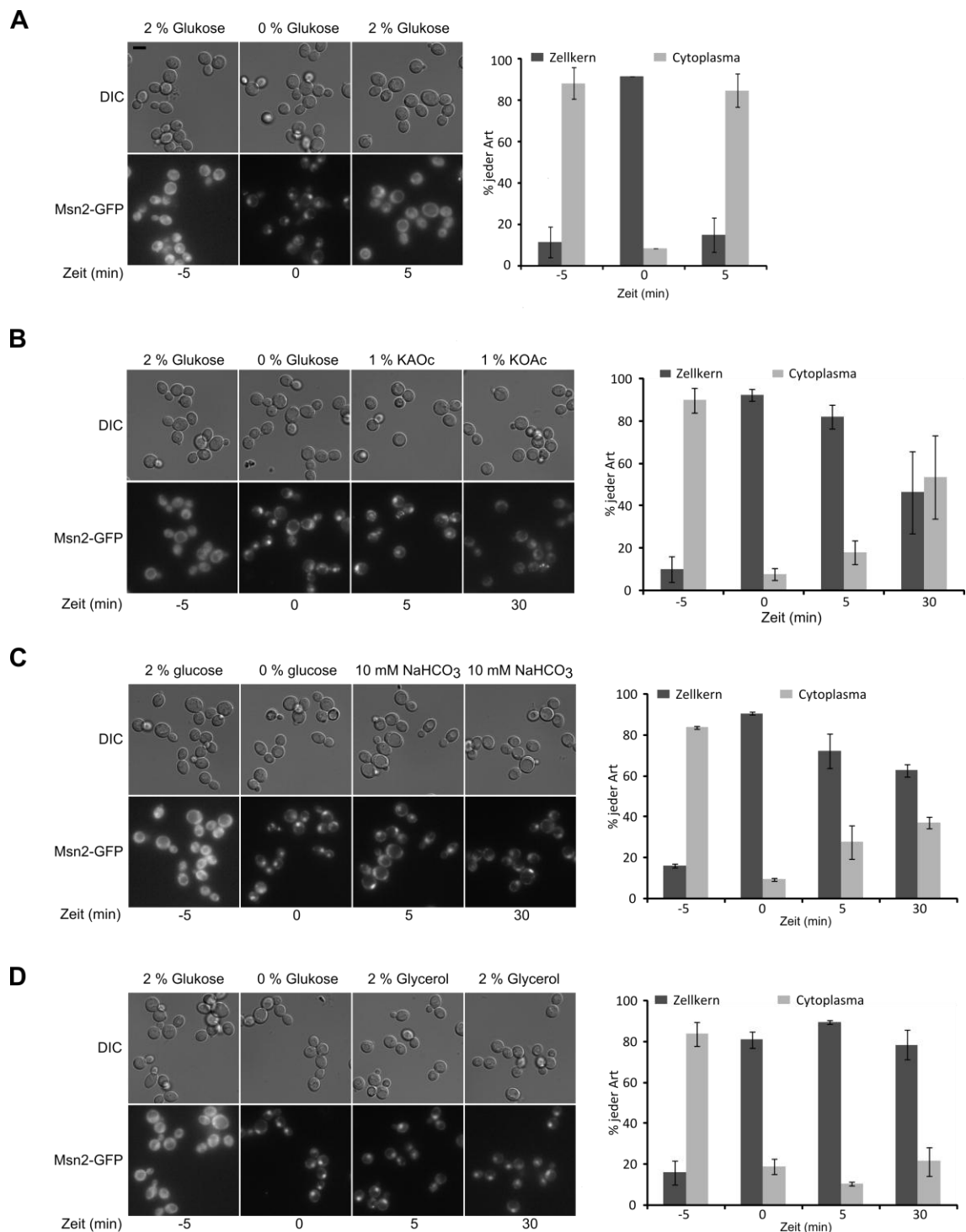
Im Fall der *ady2Δ*-Mutanten ließ sich eine Korrelation zwischen der Kapazität Acetat zu verstoffwechseln und dem Sporulationsverhalten feststellen. Die *ady2Δ CYRI*-Mutante alkalisierte das Medium weniger stark als der *CYRI*-Kontrollstamm und produzierte auch weniger Sporen. Dies deutet daraufhin, dass diese Mutante weniger

Acetat verstoffwechselt. In der *ady2Δ cyr1<sup>K1712A</sup>*-Mutante zeigten sich eine Erhöhung der Medium-Alkalisierung und eine Erhöhung der Sporezahl. In diesen beiden Mutanten besteht also eine Korrelation zwischen der Kapazität Acetat zu verstoffwechseln und dem Sporulationsverhalten.

## 2.4 Untersuchung des Einflusses verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat auf die Msn2-Lokalisation

Die bisher beschriebenen Experimente zeigen, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg essentiell für die Sporezahlkontrolle ist und dass die Erhöhung der PKA-Aktivität je nach Zeitpunkt der Erhöhung zu unterschiedlichem Sporulationsverhalten führt. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die cAMP-Konzentration während der Meiose ändert. Kurz nach Initiation der Meiose sinkt die cAMP-Konzentration, zwei bis vier Stunden nach der Initiation steigt sie wieder an (Uno *et al.*, 1990; Watson and Berry, 1977). Dies deutet darauf hin, dass sich die PKA-Aktivität während der Meiose ändert. Es stellte sich daher die Frage, wie diese Änderung erreicht wird. Während der Sporulation unter Laborbedingungen ist Kaliumacetat die einzig verfügbare Kohlenstoffquelle. Ein Einfluss von Kaliumacetat auf die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges ist bisher nicht beschrieben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das während der Sporulation entstehende  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ , durch Beeinflussung von Cyr1 einen Einfluss auf die Aktivität des Signaltransduktionsweges hat. Es sollte daher untersucht werden, ob Kaliumacetat und Bicarbonat einen Einfluss auf die PKA-Aktivität haben. Um indirekt Rückschlüsse auf die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges zu erhalten, sollte die Lokalisation von Msn2 unter vegetativen Bedingungen in Anwesenheit verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat untersucht werden. Der Transkriptionsfaktor Msn2 wird unter Stressbedingungen aktiviert und steht unter Kontrolle von PKA. In Anwesenheit von Glukose, also bei hoher PKA-Aktivität, lokalisiert Msn2 im Cytoplasma, in Abwesenheit von Glukose, bei niedriger PKA-Aktivität, hingegen im Zellkern (Gorner *et al.*, 1998; Gorner *et al.*, 2002). Durch die Untersuchung der Msn2-Lokalisation können also Rückschlüsse auf die PKA-Aktivität gezogen werden.

Um den Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat auf die PKA-Aktivität in vegetativ wachsenden Zellen zu untersuchen, wurde ein Hefestamm verwendet, der ein Msn2-GFP Fusionsprotein exprimiert. Vegetativ wachsende Zellen



**Abbildung 25: Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat auf die Lokalisation von Msn2 in vegetativ wachsenden Zellen**

Für das Experiment wurde ein *MSN2-GFP* exprimierender Hefestamm (YCT1193), der sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, verwendet. Zu Beginn des Experimentes wurden DIC- und GFP-Aufnahmen gemacht (-5 min). Anschließend wurde Glukose entfernt (0 % Glc). Fünf Minuten nach Entfernen von Glukose wurden erneut DIC- und GFP-Aufnahmen gemacht (0 min). Dann wurde entweder **A**) 2 % Glc, **B**) 1 % KOAc **C**) 10 mM Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) oder **D**) 2 % Glycerin zu den Zellen gegeben. Im Fall von Glc wurden 5 Minuten nach Zugabe wieder DIC- und GFP-Aufnahmen gemacht. In allen anderen Fällen wurden nach 5 und nach 30 Minuten DIC- und GFP-Aufnahmen aufgenommen. Die Quantifizierung der Experimente befindet sich rechts neben den mikroskopischen Aufnahmen. Es wurde die Anzahl der Zellen ermittelt (mindestens 100 Zellen pro Bedingung), in denen Msn2-GFP entweder im Zellkern oder im Cytoplasma lokalisierte. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu\text{m}$ .

wurden verwendet, da hier bekannt ist, wie sich die Lokalisation von Msn2-GFP in An- oder Abwesenheit von Glukose verändert. Die Msn2-GFP Lokalisation wurde jeweils zu Anfang des Experimentes, nach Entfernen der Kohlenstoffquelle und nach Zugabe einer neuen Kohlenstoffquelle, beziehungsweise Bicarbonat untersucht. Msn2 lokalisierte zu Anfang des Experimentes wie erwartet im Cytoplasma. Fünf Minuten nach Entfernen der Glukose lokalisierte Msn2 im Zellkern. Anschließend wurde entweder Glukose, Kaliumacetat, Bicarbonat oder Glycerin zu den Zellen gegeben und die Msn2 Lokalisation 5 und 30 Minuten nach Zugabe der Substanzen untersucht. Die Zugabe von Glukose führte zu einer raschen Relokalisierung von Msn2 in das Cytoplasma. Auch die Zugabe von Kaliumacetat und Bicarbonat führten zu einer Änderung der Lokalisierung in das Cytoplasma, allerdings verglichen mit der Zugabe von Glukose in einer geringeren Anzahl an Zellen und zu einem späteren Zeitpunkt. Die Zugabe von Glycerin hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von Msn2 (Abbildung 25).

In sporulierenden Zellen konnte keine klare Msn2-GFP Lokalisation beobachtet werden, daher ließ sich keine Aussage über den Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat auf die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges während der Sporulation treffen.

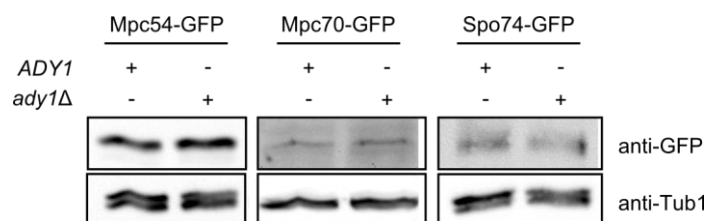
Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass neben Glukose auch Kaliumacetat und Bicarbonat einen Einfluss auf die Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges haben könnten. Dieser Einfluss ist zumindest unter vegetativen Wachstumsbedingungen schwächer als der Einfluss von Glukose.

## **2.5 Einfluss von Ady1 auf die Regulation der MP-Proteinmenge und den Aufbau der meiotischen Platte**

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Deletion von *ADY1* zu einem Verlust der Sporezahlkontrolle führt. Die *ady1Δ*-Mutante produziert überwiegend Dyaden (Deng and Saunders, 2001). Des Weiteren wurde durch eine globale Analyse der Protein-Phosphorylierung gezeigt, dass Ady1 *in vitro* von der PKA-Untereinheit Tpk3 phosphoryliert wird (Ptacek *et al.*, 2005). Dies führte zu der Überlegung, dass Ady1 an der PKA-abhängigen Regulation der Sporezahl beteiligt sein könnte. Zunächst sollte überprüft werden, ob die Menge der MP-Proteine Mpc54, Mpc70 und Spo74 in einer *ady1Δ*-Mutante verändert ist, was eine Erklärung für die gestörte Sporezahlkontrolle



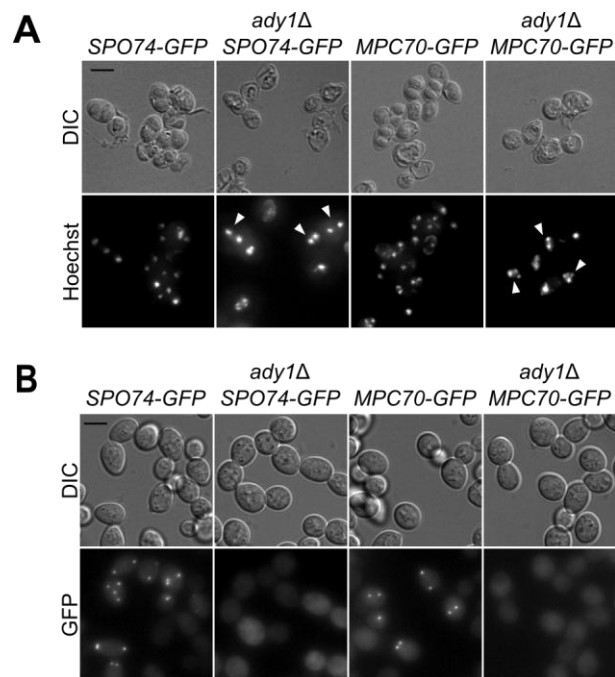
wäre. Um die MP-Proteinmenge zu untersuchen, wurden Mpc54, Mpc70 und Spo74 in einer *ady1Δ*-Mutante C-Terminal mit GFP markiert. Es ist bekannt, dass die Fusion von GFP an Mpc70 und Spo74 die Funktionalität der Proteine leicht negativ beeinflusst (Bajgier *et al.*, 2001; und meine unveröffentlichte Beobachtung). Dies führt dazu, dass die Zellen beim Sporulieren überwiegend Dyaden bilden. Ein Mpc54-Gfp Fusionsprotein ist hingegen voll funktionell. Die Überprüfung der während der Sporulation bei 1 % Kaliumacetat gebildeten Mpc54, Mpc70 und Spo74 Proteinmengen mittels Western-Analyse zeigte keine Unterschiede zwischen einer *ady1Δ*-Mutante und dem Kontrollstamm (Abbildung 26). Die gestörte Sporezahlkontrolle der *ady1Δ*-Mutante wird demnach nicht durch veränderte MP-Proteinmengen hervorgerufen.



**Abbildung 26: Western-Analyse zur Bestimmung der Proteinmenge von Mpc54, Mpc70 und Spo74 in *ady1Δ*-Mutanten und Kontrollstämmen**

Folgende Stämme wurden für die Western-Analyse verwendet: *ADY1* Mpc54-Gfp (YCT730), *ADY1* Mpc70-GFP (YAM281), *ADY1* Spo74-GFP (YUK63), *ady1Δ* Mpc54-GFP (YMJ73), *ady1Δ* Mpc70-GFP (YMJ152), *ady1Δ* Spo74-GFP (YMJ153). In den Stämmen wurde Sporulation induziert. Im Zeitraum von 4-10 h nach Initiation der Sporulation wurden stündlich Proben für den Immuno-Blot entnommen. Die Proben jedes Stammes wurden nach Beendigung des Experimentes vereinigt und für SDS-PAGE und Immunoblot verwendet. Auf diese Weise wird die gebildete Gesamtproteinmenge im Zeitraum 4-10 h nach Initiation der Sporulation analysiert. Mpc54-GFP, Mpc70-GFP und Spo74-GFP wurden mit einem gegen GFP gerichteten Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis von Tub1 mittels eines gegen Tub1 gerichteten Antikörpers, diente als Ladekontrolle.

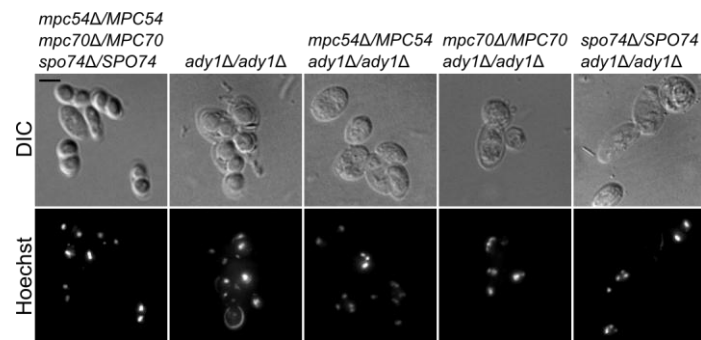
Bei der Überprüfung der Sporulation der einzelnen Mutanten fiel auf, dass nur die *ady1Δ MPC54-GFP*-Mutante sporulierte. Sowohl in der *ady1Δ MPC70-GFP*-, als auch in der *ady1Δ SPO74-GFP*-Mutante waren keine Sporen zu erkennen, obwohl die Zellen meiotische Teilungen durchgeführt hatten (Abbildung 27 A). Um zu überprüfen, ob in den Mutanten Mpc70 und Spo74 an den Spindelpolkörpern lokalisierten, wurde die Mpc70-GFP beziehungsweise Spo74-GFP Fluoreszenz während der Meiose untersucht. Die Bildung der meiotischen Platte lässt sich je nach Zahl der modifizierten Spindelpolkörper durch 1 bis 4 helle, punktuelle GFP-Signale erkennen. Dies war weder in der *ady1Δ MPC70-GFP*-, noch in der *ady1Δ SPO74-GFP*-Mutante der Fall. In Kontrollstämmen, die *Ady1* enthielten, konnte in den Zellen hingegen zwei bis vier helle GFP-Signale beobachtet werden (Abbildung 27 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass *Ady1* weder die Menge von Mpc54, Mpc70 und Spo74, noch die meiotischen Teilungen beeinflusst, aber für den Aufbau der meiotischen Platte benötigt wird. Wie bereits beschrieben sind Mpc70-GFP und Spo74-GFP nicht voll funktionell. Die



**Abbildung 27: Untersuchung der meiotischen Teilungen und der Bildung von meiotischen Platten in *ady1Δ SPO74-GFP*- und *ady1Δ MPC70-GFP*-Mutanten**

Für das Experiment wurden folgende Hefestämme verwendet: *SPO74-GFP* (YUK63), *ady1Δ SPO74-GFP* (YMJ153), *MPC70-GFP* (YAM281), *ady1Δ MPC70-GFP* (YMJ152). (A) Die Stämme wurden auf SPO-Agarplatten sporuliert und anschließend mit Hoechst 33342 gefärbt. Anschließend wurden DIC- und Fluoreszenzaufnahmen (DAPI) gemacht. Die weißen Pfeile kennzeichnen Zellen, in denen meiotische Teilungen stattfanden. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu\text{m}$ . (B) Fünf Stunden nach Induktion der Sporulation bei 1 % KOAc wurden DIC- und GFP-Aufnahmen gemacht. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu\text{m}$ .

Expression dieser Fusionsproteine könnte der heterozygoten Deletion eines der drei MP-Gene gleichkommen, da insgesamt weniger MP-Proteine zur Verfügung stehen. Zellen mit heterozygot deletierten MP-Protein-Genen produzieren hauptsächlich Dyaden (Bajgier *et al.*, 2001; Nickas *et al.*, 2003; Taxis *et al.*, 2005; Wesp *et al.*, 2001). Es sollte überprüft werden, ob die heterozygote Deletion von *MPC54*, *MPC70* oder *SPO74* in einer *ady1Δ*-Mutante ebenfalls dazu führt, dass zwar meiotische Teilungen stattfinden, aber keine Sporen gebildet werden. Dazu wurden heterozygote Deletionen von entweder *MPC54*, *MPC70* oder *SPO74* in eine *ady1Δ*-Mutante eingeführt und anschließend in den Mutanten Sporulation induziert. Der Stamm, in dem *MPC54*, *MPC70* und *SPO74* heterozygot deletiert wurden sporulierte wie erwartet, er produzierte nur Dyaden (Taxis *et al.*, 2005). Das gleiche galt für die *ady1Δ*-Mutante. Die Deletion von *ADY1* in Kombination mit heterozygoter Deletion von *MPC54*, *MPC70* oder *SPO74* hatte zur Folge, dass alle drei Mutanten zwar die meiotischen Teilungen durchführten, aber keine Sporen bildeten (Abbildung 28). Es lässt sich also sagen, dass die Verringerung der Menge an meiotischen Plaque Proteinen in Kombination mit der Deletion von *ADY1* dazu führt, dass keine meiotischen Platten gebildet und demzufolge keine Sporen gebildet werden.



**Abbildung 28: Auswirkungen der heterozygoten Deletion von *MPC54*, *MPC70* oder *SPO74* in einem *ady1Δ*-Stamm**

Für das Experiment wurden folgende Hefestämme verwendet: *mpc54Δ/MPC54 mpc70Δ/MPC70 spo74Δ/SPO74* (YCT775), *ady1Δ/ady1Δ* (YMJ68); *mpc54Δ/MPC54 ady1Δ/ady1Δ* (YMJ160); *mpc70Δ/MPC70 ady1Δ/ady1Δ* (YMJ162); *spo74Δ/SPO74 ady1Δ/ady1Δ* (YMJ161). Die Durchführung der Sporulation erfolgte wie bereits in Abbildung 27 A beschrieben. Der Maßstabsbalken entspricht 4  $\mu$ m.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine genetische Interaktion zwischen *Ady1* und *Mpc54*, *Mpc70* oder *Spo74* besteht. Möglicherweise reguliert *Ady1* in PKA-abhängiger Weise die Aktivität von *Mpc54*, *Mpc70* und *Spo74*.

# 3 Diskussion

## 3.1 Meiose-spezifische Regulation der Proteinmenge durch das TIPI-System

Diese Arbeit hat gezeigt, dass sich das Meiose-spezifische TIPI-System sehr gut für die Erzeugung von Mutanten während der Meiose eignet. Es wurden erfolgreich Ras-, Tpk- und Bcy1-Depletionsmutanten erzeugt. Der große Vorteil dieser Mutanten ist, dass die Initiation der Meiose in ihnen nicht beeinträchtigt ist und sich auf diese Weise Prozesse untersuchen lassen, die zu einem späteren Zeitpunkt eine Rolle spielen. Ein weiterer Vorteil des Systems ist es, dass es keiner Beeinflussung von außen bedarf. So muss weder das Wachstumsmedium gewechselt, noch müssen induzierend wirkende Substanzen zugegeben werden. All dies könnte den zu untersuchenden Prozess beeinflussen. Da der Ablauf der Meiose durch eine Genexpressionskaskade reguliert wird und verschiedene Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten im meiotischen Zellzyklus aktiviert werden, ist die Erzeugung von Mutanten zu einem späteren Zeitpunkt der Meiose durch Wahl eines geeigneten Promotors leicht möglich. Weiterhin werden Proteine durch das Meiose-spezifische TIPI-System nur in Zellen depletiert, die sich auch in der Meiose befinden. Man kann also sicher sein, dass beobachtete Phänotypen ausschließlich durch Beeinflussung Meiose-spezifischer Prozesse hervorgerufen werden.

Auch in anderen Organismen könnte das TIPI-System für die Erforschung von entwicklungsbiologischen Prozessen von Vorteil sein. Durch die Wahl spezifischer Promotoren kann die Expression der TEV-Protease zum Beispiel auf ein bestimmtes Gewebe oder einen spezifischen entwicklungsbiologischen Prozess beschränkt werden. Dies bietet die Möglichkeit, Proteine räumlich und zeitlich genau zu depletieren. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Zelltyp spezifische Nutzung der TEV Protease in der schwarzbäuchigen Taufliege *Drosophila melanogaster* möglich ist (Pauli *et al.*, 2008).

Der Versuch Cyr1 während der Meiose zu depletieren hat jedoch gezeigt, dass es unter Umständen schwierig ist zu überprüfen, ob der Einsatz des TIPI-Systems erfolgreich war oder nicht. Cyr1 konnte weder mittels Immunoblot detektiert werden, noch konnte in den Mutanten ein eindeutiger Phänotyp beobachtet werden. Dieses Problem kann bei

der Erzeugung von herkömmlichen, konditionalen Mutanten jedoch auch auftreten. Insgesamt lässt sich sagen, dass ein Großteil der, während unserer Forschungsarbeit getesteten Proteine durch das TIPI-System erfolgreich depletiert werden konnten (Jungbluth *et al.*, 2010, Taxis *et al.*, 2009, und diese Arbeit).

Eine weitere Verbesserung des TIPI-Systems konnte in dieser Arbeit durch Herstellung des *loxP::klURA3::loxP::GFP-TDegF-SF3B-3HA*-Degradationskonstruktes (pMJ13) erreicht werden. Der große Vorteil der Nutzung dieses Degradationskonstrukts ist, dass die Expression des modifizierten Gens, nach Entfernung des *klURA3*-Auxotrophiemarkers durch das *cre/loxP*-Rekombinationssystem (Guldener *et al.*, 1996) von seinem endogenen Promotor kontrolliert wird. So können auch Gene modifiziert werden, deren Überexpression schädlich für die Zelle oder hinderlich für den zu untersuchenden Prozess wäre. Falls das zu untersuchende Gen essentiell ist, muss die Modifizierung mit dem Konstrukt zunächst heterozygot in einem diploiden Stamm erfolgen. Nach Entfernen des *klURA3*-Markers können nach einer Tetradendisektion kompatible haploide Sporen miteinander gekreuzt werden. Alternativ ist auch die weitere Arbeit mit haploiden Stämmen möglich.

### **3.2 Wahrnehmung und Weiterleitung des Acetatsignals während der Sporulation**

Bei der Sporulation unter Laborbedingungen ist Kaliumacetat die einzig verfügbare Kohlenstoffquelle. Da der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg, wie in dieser Arbeit gezeigt, an der Regulation der Sporenzahl beteiligt ist, stellt sich die Frage, wie das Acetatsignal von der Zelle wahrgenommen und die Weiterleitung des Signals durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg zu unterschiedlichen zellulären Antworten führt.

Diese Fragestellung ist während des vegetativen Wachstums für das Glukosesignal gut untersucht. Extrazellulär vorhandene Glukose wird durch das Gpr1-Gpa2-Rezeptorsystem wahrgenommen (Lorenz *et al.*, 2000; Rolland *et al.*, 2000), während die beiden GTPasen Ras1 und Ras2 vermutlich für die Wahrnehmung intrazellulär vorhandener Glukose verantwortlich sind (Kataoka *et al.*, 1984; Toda *et al.*, 1985; Wigler *et al.*, 1988). Extrazellulär vorhandene Glukose wird vom Gpr1-Rezeptor erkannt, dies führt zur Aktivierung von Gpa2, das dann Cyr1 aktiviert (Smets *et al.*, 2010). Wie genau intrazellulär vorhandene Glukose wahrgenommen und das Glukosesignal an den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg weitergeleitet wird ist bisher

nicht abschließend geklärt worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme und anschließende Phosphorylierung von Glukose eine wichtige Rolle spielen. Für die Phosphorylierung von Glukose sind die Kinasen Hxk1, Hxk2 und Glk1 zuständig (Bianconi, 2003; Clifton *et al.*, 1993; Walsh *et al.*, 1983). Studien haben gezeigt, dass mindestens eine dieser Kinasen notwendig und hinreichend für die Induktion des cAMP-Signals durch Glukose ist (Beullens *et al.*, 1988; Rolland *et al.*, 2000). Die allgemeine Meinung ist, dass das intrazelluläre Glukose-Phosphorylierungs-Signal über Ras1 und Ras2 zu einer Aktivierung von Cyr1 führt (Casperson *et al.*, 1983; Field *et al.*, 1988; Kataoka *et al.*, 1984; Toda *et al.*, 1985; Wigler *et al.*, 1988). Wird Glukose zu Glukose-gehungerten Zellen gegeben resultiert dies in einem transienten Anstieg an GTP-beladenem Ras2. Studien haben gezeigt, dass auch für diesen Prozess die Phosphorylierung von Glukose wichtig ist (Colombo *et al.*, 2004; Mbonyi *et al.*, 1988). Auf welche Weise die Phosphorylierung von Glukose die GTP-Beladung von Ras2 beeinflusst ist nicht bekannt.

### **3.2.1 Während der Sporulation dient Bicarbonat als Maß der Acetatverfügbarkeit und übt einen negativen Einfluss auf Cyr1 aus**

Die Sporulation in *S. cerevisiae* stellt einen zellulären Differenzierungsprozess dar. Auch aus anderen Pilzen sind Differenzierungsprozesse bekannt, die von der Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges reguliert werden. Studien haben gezeigt, dass ein metabolisches Signal, das zu einer Aktivierung des Signaltransduktionsweges führt, CO<sub>2</sub>, beziehungsweise Bicarbonat ist. Es ist bekannt, dass Bicarbonat viele Adenylylzyklasen der Klasse III, zu denen auch Cyr1 aus *S. cerevisiae* gehört<sup>5</sup>, aktiviert. Die Aktivierung von Adenylylzyklasen durch Bicarbonat ist nicht nur aus Pilzen, sondern auch aus Prokaryoten und Säugetierzellen bekannt (Buck *et al.*, 1999; Cann *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2010; Jaiswal and Conti, 2001; Klengel *et al.*, 2005). Die Adenylylzyklase Cya1 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 wird hingegen von Bicarbonat inhibiert (Masuda and Ono, 2005).

Beim humanpathogenen Pilz *Candida albicans* geht man davon aus, dass CO<sub>2</sub> und Bicarbonat Signalmoleküle sind und die Adenylylzyklase als ein evolutionär konservierter Bicarbonatsensor fungiert (Chen *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2010; Klengel *et al.*, 2005). Für *C. albicans* ist es von entscheidender Bedeutung, die CO<sub>2</sub>-Konzentration

<sup>5</sup><http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR001054>

in der Umgebung wahrzunehmen. Im Laufe der Infektion trifft der Pilz auf höchst unterschiedliche CO<sub>2</sub>-Konzentrationen, die von 0,033 % in der normalen Luft, bis zu 5 % im Gewebe oder Blut von Säugetieren variieren (Klengel *et al.*, 2005). Die Pathogenität des Pilzes wird entscheidend durch einen morphologischen Wechsel von der Hefeform zu der filamentösen Form beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass *C. albicans* Stämme, die keine Filamente bilden können, avirulent sind (Lo *et al.*, 1997). Der Wechsel von der Hefeform zur filamentösen Form wird in *C. albicans* durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert (Rocha *et al.*, 2001). CO<sub>2</sub>, bzw. Bicarbonat spielen für die Pathogenität des Pilzes eine große Rolle, da Bicarbonat durch Aktivierung der Adenylylzyklase die cAMP-Produktion stimuliert und so das filamentöse Wachstum induziert (Klengel *et al.*, 2005). Auf hohe CO<sub>2</sub>/Bicarbonat-Konzentrationen trifft der Pilz ausschließlich im Gewebe oder Blut des Wirtes, die durch die Filamentation bewirkte Gewebeinvasion trägt entscheidend zur Virulenz bei. Wie wichtig die intrazelluläre Konversion von CO<sub>2</sub> zu Bicarbonat durch die Carbonanhydrase Nce103 ist, wird durch die Beobachtung deutlich, dass eine *C. albicans nce103Δ*-Mutante in normaler Luft nicht wächst, keine Filamente bildet und daher auch keine Gewebeinvasion stattfindet. Diese Defekte werden durch Inkubation der Mutante in CO<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre aufgehoben (Klengel *et al.*, 2005).

Ein weiterer humanpathogener Pilz und entfernter Verwandter von *C. albicans* ist *Cryptococcus neoformans*. Dieser befällt vor allem das zentrale Nervensystem in immunsupprimierten Patienten. Dabei ist ebenfalls ein Differenzierungsprozess, die Biosynthese der sogenannten Polysaccharid-Kapsel, die *C. neoformans* im Laufe der Infektion umschließt und schützt, entscheidend für seine Pathogenität. Die Biosynthese dieser Kapsel wird durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert und auch dabei spielt die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Umgebung eine große Rolle (Alspaugh *et al.*, 2002; Granger *et al.*, 1985; Janbon, 2004; Zaragoza *et al.*, 2003). Für die Adenylylzyklase aus *C. neoformans* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie durch Bicarbonat aktiviert wird (Klengel *et al.*, 2005).

Die Sporulation von *S. cerevisiae* ist ebenfalls ein Differenzierungsprozess, der durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert wird. Diese Arbeit hat gezeigt, dass CO<sub>2</sub>/Bicarbonat auch in *S. cerevisiae*, ähnlich wie in *C. albicans* oder *C. neoformans*, einen Einfluss auf diesen Prozess hat (Abbildung 16). Im Gegensatz zu den beiden genannten Pilzen trifft *S. cerevisiae* in ihrem natürlichen Umfeld normalerweise aber nicht auf erhöhte CO<sub>2</sub>-Konzentrationen. CO<sub>2</sub> entsteht aber bei der Verstoffwechslung

von Glukose und Acetat. Glukose wird durch mehrere enzymatische Zwischenschritte während der Glykolyse in Pyruvat umgewandelt. Die dabei frei werdende Energie wird zur Produktion von ATP und NADH genutzt. Durch die aerobe Respiration wird Pyruvat innerhalb der Mitochondrien zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> umgewandelt. Acetyl-CoA wird dann in den Citratzyklus eingespeist und in diesem zu H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> oxidiert. Während der Sporulation wird Kaliumacetat zu Acetyl-CoA umgewandelt und über die oben beschriebenen Stoffwechselwege verwertet (Strijbis and Distel, 2010). Das bei diesen Prozessen entstehende CO<sub>2</sub> wird entweder unter Beteiligung der Carbonanhydrase Nce103 oder spontan durch Hydratisierung in Lösung zu Bicarbonat.

Auch für *S. cerevisiae* wird vermutet, dass Bicarbonat ähnlich wie in *C. albicans* und *C. neoformans* als Signalmolekül dient. Es wurde gezeigt, dass Bicarbonat einen positiven Einfluss auf die Sporulation ausübt, über welche molekularen Mechanismen dieser Einfluss vermittelt wird ist aber bisher unklar (Hayashi *et al.*, 1998b; Ohkuni *et al.*, 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit früheren Untersuchungen, da auch hier ein positiver Einfluss von Bicarbonat auf die Sporulation beobachtet wurde (Abbildung 16). Ebenfalls hatten Mutationen, die zu einer Verringerung der PKA-Aktivität führten einen positiven Einfluss auf die Sporulation (Abbildung 10, 11 und 22). PKA-Aktivität beeinflusst demnach die Sporenbildung negativ. Da auch Bicarbonat zu einer allgemein erhöhten Sporenzahl führte, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Bicarbonat zu einer verringerten PKA-Aktivität führt, indem es Cyr1 negativ beeinflusst. Die externe Zugabe von CO<sub>2</sub> führte allerdings nicht bei niedrigen Kaliumacetatkonzentrationen zu einer Erhöhung der Sporenzahl (Abbildung 16). Vermutlich wird für die Umwandlung von CO<sub>2</sub> in HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> eine gewisse Menge Acetat benötigt. Bei geringen Acetatkonzentrationen könnte die externe Zugabe von CO<sub>2</sub> eventuell nicht zur ausreichenden Bildung von Bicarbonat führen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Möglichkeit, wie das Acetatsignal wahrgenommen und an den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg weitergeleitet wird, durch die Bildung von Bicarbonat bei der Verstoffwechslung von Acetat ist. Es ist bekannt, dass Hefezellen in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen Acetat auch unterschiedliche Mengen Bicarbonat produzieren (Dickinson *et al.*, 1983). Die Produktion von Bicarbonat durch den Acetatstoffwechsel und Nce103 könnte während der Sporulation also als Maß der Acetatverfügbarkeit dienen. Wenn man davon ausgeht, dass Bicarbonat die Aktivität von Cyr1 negativ beeinflusst, würden unterschiedliche Acetatmengen auf diese Weise in unterschiedliche PKA-Aktivitäten umgesetzt werden.



In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Rolle der Ras-Proteine bei der Regulation. Es konnte gezeigt werden, dass aktives Ras während der gesamten Sporulation vorhanden ist und dass die Ras-Aktivität nicht an die Nährstoffverfügbarkeit angepasst wird (C. Taxis, persönliche Kommunikation). Ras scheint also nicht an der Anpassung der Cyr1-Aktivität an unterschiedliche Nährstoffbedingungen beteiligt zu sein. Vermutlich sorgen die Ras-Proteine für eine basale Cyr1-Aktivität, die von Bicarbonat weiter moduliert wird. Ebenso ist denkbar, dass die Ras-Proteine benötigt werden um die Bicarbonat-Sensitivität von Cyr1 sicherzustellen.

Dass Cyr1 aus *S. cerevisiae* grundsätzlich Bicarbonat-sensitiv sein könnte, zeigt sich dadurch, dass es zur Klasse III der Adenylylzyklasen<sup>6</sup> gehört. Viele Mitglieder dieser Klasse sind Bicarbonat-sensitiv (Cann *et al.*, 2003). Weiterhin konnte in dieser Arbeit durch Sequenzvergleiche ein Lysin im aktiven Zentrum von Cyr1 identifiziert werden (K1712), das an analoger Stelle auch in den Adenylylzyklasen von *C. albicans* und *Anabaena sp* vorhanden ist und dort für die Koordination des Bicarbonations zuständig ist (Cann *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2010). Die Mutation dieses Lysins zu Alanin führt in den genannten Adenylylzyklasen zu einem Verlust der Bicarbonat-Sensitivität und einer starken Verringerung ihrer Aktivität. Die in dieser Arbeit erzeugte *cyr1*<sup>K1712A</sup>-Mutante zeichnete sich ebenfalls durch einen Aktivitätsverlust aus, wie durch die Färbung über Ioddämpfen gezeigt werden konnte (Abbildung 21). Ob die Mutation auch in *S. cerevisiae* zu einem Verlust der Bicarbonat-Sensitivität führt, konnte in dieser Arbeit nicht untersucht werden, da das Einbringen der Mutation sowohl in Wildtypstämme als auch in *ady2Δ*-Mutanten zu einem Verlust der Sporezahlkontrolle, beziehungsweise des *ady2Δ*-Phänotyps führte (Abbildung 22).

Die Zugabe von Bicarbonat oder Kaliumacetat zu Glukose-depletierten, vegetativ wachsenden Zellen führte zu einer Änderung der Msn2-GFP-Lokalisation vom Zellkern in das Cytoplasma (Abbildung 25). Dieses Ergebnis spricht für einen positiven Einfluss von Bicarbonat auf Cyr1. Da der Einfluss von Bicarbonat auf Cyr1 während der Sporulation höchstwahrscheinlich negativer Natur ist, stellt sich die Frage auf welche Weise Cyr1 während des vegetativen Wachstums positiv und während der Sporulation negativ von Bicarbonat beeinflusst werden kann. Viele Adenylylzyklasen der Klasse III werden von Bicarbonat positiv beeinflusst (Cann *et al.*, 2003). Hingegen wird die Adenylylzyklase Cya1 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* Strain PCC 6803,

<sup>6</sup> <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR001054>

die ebenfalls zur Klasse III der Adenylylzyklen gehört, von Bicarbonat negativ beeinflusst. Es ist allerdings nicht bekannt, welche Sequenzunterschiede im Vergleich zu anderen Adenylylzyklen für dieses Verhalten verantwortlich sind (Masuda and Ono, 2005). Grundsätzlich wird angenommen, dass die Bicarbonation eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum der Adenylylzyklase herbeiführt, die zu einer höheren Prozessivität des Enzyms führt (Steegeborn *et al.*, 2005). Im Bezug auf Cyr1 aus *S. cerevisiae* wäre es denkbar, dass posttranslationale Modifikationen dazu führen, dass Cyr1 während des vegetativen Wachstums durch Bicarbonat stimuliert, während der Sporulation hingegen inhibiert wird. Eine weitere denkbare Möglichkeit ist, dass die Koordination des Bicarbonations im aktiven Zentrum von Cyr1 dazu führt, dass die Aktivierung von Cyr1 durch Ras nicht mehr so effektiv funktioniert.

Die Deletion von *NCE103* hat gezeigt, dass die Konversion von CO<sub>2</sub> zu Bicarbonat für die Sporulation und Sporezahlkontrolle wichtig ist (Abbildung 19). Dafür spricht auch, dass die Expression von *NCE103* während der Sporulation induziert wird (Friedlander *et al.*, 2006; Primig *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Ady2 an der Acetataufnahme beteiligt ist, da in einer *ady2Δ*-Mutante kein aktiver Acetattransport mehr stattfindet (Paiva *et al.*, 2004). Dies zeigt sich auch dadurch, dass die *ady2Δ*-Mutante das Sporulationsmedium weniger stark alkalisiert als der Kontrollstamm (Abbildung 24). Da weniger Acetat zur Verfügung steht, entsteht auch weniger CO<sub>2</sub>/Bicarbonat. Wenn man davon ausgeht, dass Bicarbonat das Sporezahlregulierende Molekül ist, würde dies erklären, warum eine *ady2Δ*- und eine *nce103Δ* einen ähnlichen Sporulationsphänotyp besitzen (Abbildung 16 und 19). In beiden Mutanten steht weniger CO<sub>2</sub>/Bicarbonat zur Verfügung. Dies würde zu einer Erhöhung der PKA-Aktivität und damit zu einer negativen Beeinflussung der Sporenbildung führen. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die Zugabe von CO<sub>2</sub>/Bicarbonat zu einer *ady2Δ*-Mutante zu einem Verlust des *ady2Δ*-Phänotyps führt (Abbildung 16). Bicarbonat, bzw. der Prozess der Bicarbonatbildung durch Nce103 wirkt in einem Signaltransduktionsweg demnach unterhalb von Ady2. Auch Cyr1 lässt sich unterhalb von Ady2 einordnen, da Verringerung der Cyr1-Aktivität (*cyr1<sup>K1712A</sup>*) ebenfalls zu einer Supprimierung des *ady2Δ*-Phänotyps führt (Abbildung 22). Auch hier zeigt sich, dass Bicarbonat vermutlich einen negativen Einfluss auf Cyr1 ausübt, da die Supprimierung des *ady2Δ*-Phänotyps sowohl durch Bicarbonat, als auch durch verringerte Cyr1-Aktivität erreicht werden konnte.

PKA-Aktivität beeinflusst die Energieproduktion und den Kohlenstoffmetabolismus (Carlucci *et al.*, 2008; Feliciello *et al.*, 2005; Hedbacker *et al.*, 2004; Hlavata and Nystrom, 2003; Leadsham and Gourlay, 2010; Ordiz *et al.*, 1996; Ptacek *et al.*, 2005; Roosen *et al.*, 2005; Schneper *et al.*, 2004; Swiegers *et al.*, 2006; Zaman *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte durch Überprüfung der Alkalisierung des Sporulationsmediums ebenfalls gezeigt werden, dass PKA-Aktivität den Stoffwechsel, beziehungsweise die Aufnahme von Acetat beeinflusst (Abbildung 24). Auf diese Weise beeinflusst der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg auch die Produktion von Bicarbonat und könnte damit letztendlich auch die Aktivität von Cyr1 beeinflussen, wodurch eine Bicarbonat abhängige Rückkopplungsschleife auf den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg entsteht. Ebenfalls könnte Bicarbonat eine Pufferfunktion für den intrazellulären pH-Wert haben. Da intrazelluläre Azidifizierung die PKA-Aktivität beeinflusst (Dechant *et al.*, 2010; Thevelein, 1991), könnte die Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes durch die Produktion von Bicarbonat dieser Aktivierung entgegenwirken.

Die Produktion von CO<sub>2</sub>/Bicarbonat durch die Verstoffwechselung von Kaliumacetat scheint für die Sporezahlkontrolle wichtiger zu sein, als die Produktion von Energie. Diese Vermutung wird durch verschiedene Beobachtungen unterstützt. Eine Erhöhung der Sporezahl lässt sich durch Depletion von Ras oder Tpk, durch Verringerung der Cyr1-Aktivität (*cyr1<sup>K1712A</sup>*), Erhöhung der CO<sub>2</sub>-Konzentration oder durch Überexpression von MP-Genen (Taxis *et al.*, 2005) erzielen. Dies zeigt, dass die Zellen grundsätzlich genügend Energiereserven besitzen, um eine hohe Zahl Sporen produzieren zu können. Die Reduktion der Sporezahl unter schlechten Nährstoffbedingungen dient also vermutlich dazu, die gebildeten Sporen mit einer Mindestausstattung an Nährstoffen zur Überdauerung der Mangelbedingungen zu versorgen. Dafür spricht, dass der Großteil des aufgenommenen Kaliumacetats nicht für die Produktion von Energie sondern für die Synthese von Speicherkohlenhydraten, wie Trehalose verwendet wird (Dickinson *et al.*, 1983).

### **3.3 Aktivität des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges ist essentiell für die Regulation der Sporezahl**

Diese Arbeit hat gezeigt, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg essentiell für die Regulation der Sporezahl ist und einen negativen Einfluss auf die Sporenbildung hat. Eine Verringerung der PKA-Aktivität während der Sporulation führte zu einem Verlust

der Sporenzahlkontrolle. Diese Erkenntnis fügt dem Signaltransduktionsweg eine weitere wichtige Funktion nach der Initiation der Meiose hinzu. In einer Studie von McDonald *et al.*, 2009 wurde gezeigt, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg, im Zusammenspiel mit Ime2, die MAP-Kinase Smk1 reguliert (McDonald *et al.*, 2009). Diese wird für die Bildung der Sporenwand benötigt. Die Autoren der Studie konnten zeigen, dass Smk1 und damit die Bildung der Sporenwand vom cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg negativ und von Ime2 positiv reguliert wird. Die Entscheidung, wie viele Sporen bei der Sporulation gebildet werden, spielt sich zeitlich aber vor der Bildung der Sporenwand ab (Gordon *et al.*, 2006; Taxis *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse sind also von der Regulation von Smk1 durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg unabhängig.

Es sind mehrere Möglichkeiten denkbar, wie der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg die Sporenzahlkontrolle beeinflussen könnte.

Eine denkbare Möglichkeit ist die Beeinflussung der Energieproduktion und des Kohlenstoffmetabolismus durch PKA-Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass PKA-Aktivität die mitochondrielle Respirationskapazität beeinflusst (Carlucci *et al.*, 2008; Feliciello *et al.*, 2005; Hlavata and Nystrom, 2003; Leadsham and Gourlay, 2010). Dies würde die Energieproduktion im Allgemeinen betreffen. Weiterhin ist bekannt, dass PKA-Aktivität direkt und indirekt die Menge und Aktivität bestimmter Enzyme aus dem Glyoxylat- und TCA-Zyklus beeinflusst (Hedbacker *et al.*, 2004; Ordiz *et al.*, 1996; Ptacek *et al.*, 2005; Roosen *et al.*, 2005; Schneper *et al.*, 2004; Swiegers *et al.*, 2006; Zaman *et al.*, 2008). Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Verbindung zwischen verschiedenen Enzymen aus dem Glyoxylatzyklus und der Produktion einer hohen Sporenzahl besteht (Nickas *et al.*, 2004). So führt die Deletion von *ICL1* (Genprodukt katalysiert die Umsetzung von Isocitrat zu Glyoxylat) und *MLS1* (Glyoxylat zu Malat) zu einer erhöhten Bildung von Dyaden. Die Autoren der Studie postulieren, dass sich während der Umsetzung von Acetat durch den Glyoxylatzyklus ein intermediäres Metabolit ansammelt, das als Maß für die verfügbare Menge an Acetat dient. Mls1 wird *in vitro* durch Tpk3 phosphoryliert (Ptacek *et al.*, 2005). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg die Sporenzahl durch Beeinflussung des Glyoxylatzyklus regulieren könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass CO<sub>2</sub>/Bicarbonat ein weiteres Metabolit ist, das sich während des Stoffwechsels von Acetat ansammelt und über die Regulation der Sporenzahl bestimmt. Ob in diesem Zusammenhang das von Nickas *et al.* postulierte

Metabolit für die Regulation der Sporenzahl eine Rolle spielt, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg hat einen generellen Einfluss auf die Genexpression. Etwa 90 % der transkriptionellen Änderungen, die nach Zugabe von Glukose zu Glukose-gehungerten Zellen beobachtet werden, können durch artifizielle Aktivierung der PKA rekapituliert werden (Wang *et al.*, 2004). PKA aktiviert unter anderem die Transkription einer Reihe von Genen, die für ribosomale Proteine kodieren (Griffioen *et al.*, 1994; Herruer *et al.*, 1987; Kraakman *et al.*, 1993). Es ist bekannt, dass PKA die nukleäre Lokalisation und Bindung des transkriptionellen Aktivators Sfp1 an Promotoren von Genen fördert, die für ribosomalen Proteine kodieren (Marion *et al.*, 2004). Ebenfalls ist PKA an der Induktion der Expression dieser Gene beteiligt, indem es die Kinase Yak1 inhibiert, diese fördert die Aktivität des transkriptionellen Corepressors Crf1 (Martin *et al.*, 2004). Nicht zuletzt inhibiert PKA den Import von Maf1 in den Zellkern und fördert damit indirekt die Proteinbiosynthese. Maf1 reprimiert die Transkription der 5S RNA und von tRNAs, die von der RNA Polymerase III transkribiert werden (Moir *et al.*, 2006; Willis and Moir, 2007). Auch die Transkription durch die RNA Polymerase II wird von PKA beeinflusst (Howard *et al.*, 2003). Der generelle Einfluss von PKA auf die Proteinbiosynthese würde auch die Expression der MP-Proteine betreffen. Auf diese Weise könnte unterschiedliche PKA-Aktivität unterschiedliche Mengen an MP-Proteinen erzeugen, dies hätte einen Einfluss auf die Regulation der Sporenzahl (Taxis *et al.*, 2005). Die generelle Hemmung der Proteinbiosynthese durch geringe PKA-Aktivität würde die Expression aller Proteine betreffen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Kaliumacetatkonzentrationen keinen Einfluss auf die Ime2-Proteinmenge haben. Ähnliches wurde für die Menge an Tub1 beobachtet (Abbildung 10 A, 11 A und 14 A). Dies spricht gegen die Hypothese, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg die Sporenzahl durch eine generelle Hemmung der Proteinbiosynthese beeinflusst. Desweiteren ist bekannt, dass die cAMP-Konzentration nach Initiation der Meiose ansteigt (Uno *et al.*, 1985; Watson and Berry, 1977) und dass die Expression von *BCY1* nach Initiation der Meiose abnimmt (Chu *et al.*, 1998; Friedlander *et al.*, 2006; Primig *et al.*, 2000). Daraus kann man schließen, dass die PKA-Aktivität während der Meiose nicht gering und die Proteinbiosynthese nicht generell gehemmt ist. Es existieren keine Vergleiche der generellen Biosynthese zwischen vegetativ wachsenden und sporulierenden Zellen. Die Proteinbiosynthese könnte in sporulierenden Zellen

allgemein geringer sein. Es ist aber unwahrscheinlich, dass dies zur Regulation der Sporenzahl beiträgt.

Wahrscheinlicher ist eine direkte Beeinflussung der Expression von meiotische Platte Genen oder des Acetattransports. Es ist bekannt, dass PKA-Aktivität den Transkriptionsfaktor Ime1 und den transkriptionellen Komplex Hap2/3/4/5 beeinflusst. Während Ime1 die Expression von *MPC54* reguliert, wird die Expression von *MPC70* durch den Hap2/3/4/5-Komplex beeinflusst (Chen and Powers, 2006; Lee *et al.*, 2002; Pedruzzi *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2006; Vidan and Mitchell, 1997). Zusätzlich ist bekannt, dass die Expression von *MPC54*, *SPO74* und *ADY2* von der PKA-Aktivität abhängt (Wang *et al.*, 2004). Die Expression von *ADY2*, *MPC54* und *MPC70* nahm ab, wenn Zellen nach dem *commitment* in Glukose haltiges Vollmedium transferiert wurden (Friedlander *et al.*, 2006). Diese Studien zeigen, dass die PKA-Aktivität auch einen direkten Einfluss auf die Produktion der MP-Proteine und Ady2 hat. Da die Menge der meiotischen Platte Proteine einen direkten Einfluss auf die Regulation der Sporenzahl hat (Taxis *et al.*, 2005), ist es sehr wahrscheinlich, dass PKA-Aktivität auf diese Weise die Sporenzahl beeinflusst.

Neben der MP-Proteinmenge könnte PKA-Aktivität auch den Aufbau der meiotischen Platte oder die Bildung der Prosporenmembran beeinflussen. In dieser Arbeit konnte eine genetische Interaktion zwischen Ady1 und Proteinen der meiotischen Platte gezeigt werden. Es ist bekannt, dass Mpc54, Spo14 und Don1 in einer *ady1Δ*-Mutante nur an ein oder zwei, statt an vier Spindelpolkörpern lokalisieren (Deng and Saunders, 2001). Die Dislokalisierung dieser Proteine spricht für eine frühe Funktion von Ady1 während des Aufbaus der meiotischen Platte und der Synthese der Prosporenmembran. Das Enzym Spo14 ist eine Phospholipase und wird für die Bildung der Prosporenmembran benötigt (Rose *et al.*, 1995; Rudge *et al.*, 1998). Don1 lokalisiert bei der Bildung der Prosporenmembran an allen vier Spindelpolkörpern und zeigt kurz bevor sich diese schließt an ihrer Öffnung eine ringförmige Lokalisation (Knop and Strasser, 2000; Moreno-Borchart and Knop, 2003; Nickas *et al.*, 2003). In einer *ady1Δ*-Mutante zeigt sich dieses ringförmige Lokalisationsmuster in vielen Zellen nicht (Deng and Saunders, 2001), dies spricht für eine Störung bei der Bildung der Prosporenmembran. Die Autoren der Studie vermuten, dass Ady1 entweder für den Einbau von Mpc54 in die meiotische Platte oder für die korrekte Duplizierung der Spindelpolkörper zuständig ist. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprechen dafür, dass Ady1 am korrekten Einbau der MP-Proteine in die meiotische Platte beteiligt ist. Zunächst konnte eine

genetische Interaktion zwischen *Ady1* und den MP-Proteinen gezeigt werden. Eine weitere negative genetische Interaktion besteht zwischen *Ady1* und *Hap3* (Costanzo *et al.*, 2010). Eine *hap3Δ ady1Δ*-Doppelmutante vollzieht zwar meiotische Teilungen, bildet aber keine Sporen (C. Taxis, persönliche Kommunikation). *Hap3* ist als Teil des transkriptionellen *Hap2/3/4/5*-Komplexes an der Expression von *MPC70* beteiligt (Lee *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2006). Man kann demnach davon ausgehen, dass in einer *hap3Δ*-Mutante weniger *Mpc70* zur Verfügung steht. Folglich zeigt die *hap3Δ ady1Δ*-Doppelmutante einen ähnlichen Phänotyp wie eine *ady1Δ*-Mutante, die eine heterozygote Deletion von *MPC70* trägt oder ein *Mpc70*-GFP-Fusionsprotein exprimiert (Abbildung 27 und 28). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in einer *ady1Δ*-Mutante weder *Mpc70*-GFP, noch *Spo74*-GFP am Spindelpolkkörper lokalisieren, was dafür spricht, dass sie nicht an die meiotische Platte binden können (Abbildung 27 B). Da *Ady1* von *Tpk3* *in vitro* phosphoryliert wird (Ptacek *et al.*, 2005) lässt sich vermuten, dass PKA-Aktivität durch Beeinflussung von *Ady1* den Aufbau der meiotischen Platte und damit die Sporenzahl reguliert. Über die genaue Rolle von *Ady1* beim Aufbau der meiotischen Platte lässt sich nur spekulieren. *Ady1* lokalisiert während der gesamten Sporulation im Zellkern und nicht etwa an den Spindelpolkkörpern (Deng and Saunders, 2001). Als Interaktionspartner von *Ady1* wurde die Kinase *Hrr25* identifiziert (Hoekstra *et al.*, 1991; Petronczki *et al.*, 2006). Es ist denkbar, dass *Ady1* die Aktivität dieser Kinase kontrolliert oder ihre Substrate rekrutiert. *Hrr25* könnte durch Phosphorylierung von Spindelpolkörperkomponenten an der Aktivierung der Spindelpolkörper oder der Bildung der meiotischen Platte beteiligt sein. Ein weiterer Interaktionspartner von *Hrr25* ist *Don1* (Petronczki *et al.*, 2006). *Ady1* könnte durch Rekrutierung von *Hrr25* zu *Don1* zusätzlich zur Beeinflussung des Aufbaus der meiotischen Platte also auch die Bildung der Prosporenmembran beeinflussen. Dies würde erklären, warum *Don1* und *Mpc54* in einer *ady1Δ*-Mutante keine Wildtyp-Lokalisation zeigen.

Die Modifikation des Spindelpolkörpers mit der meiotischen Platte und die Regulation der MP-Proteinmenge sind die zwei Prozesse, durch die die Sporenzahl an unterschiedliche Acetatmengen angepasst wird. Da beide Prozesse durch PKA-Aktivität beeinflusst werden, ist es wahrscheinlich, dass dies die Rolle des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges während der Sporenzahlregulation ist. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass PKA-Aktivität die Affinität der Spindelpolkörper gegenüber den MP-Proteinen reguliert.

### 3.3.1 Modulation und zeitliche Koordinierung sind für die Regulation der Sporenzahl essentiell

Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate zeigen, dass der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg, ähnlich wie unter vegetativen Wachstumsbedingungen, auch während der Meiose zelluläre Prozesse in Abhängigkeit der verfügbaren Nährstoffe reguliert. Dass Nährstoffsignale neben der Initiation der Meiose auch spätere Prozesse, wie die Bildung der Sporen, während der Sporulation beeinflussen können, wurde in einer Studie von Lee und Honigberg gezeigt. In dieser Studie wurde *IME1* in Zellen überexprimiert, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden und denen geringe Mengen an Glukose zur Verfügung standen. Dies führte dazu, dass die Meiose initiiert wurde und Prozesse wie DNA-Replikation oder Rekombination stattfanden. Die Anwesenheit von Glukose führte allerdings dazu, dass Prozesse wie die Segregation der Chromosomen oder Sporenbildung nicht stattfanden. Die Zellen arretierten zeitlich vor der späten Prophase. Wurden die arretierten Zellen in Sporulationsmedium gegeben, setzten sie das meiotische Programm fort (Lee and Honigberg, 1996). Auch aus einer anderen Studie ist bekannt, dass Hefezellen im gesamten Verlauf der Sporulation auf Nahrungssignale mit einer Anpassung der Genexpression reagieren (Friedlander *et al.*, 2006). Dies zeigt, dass die Sporulation ein Differenzierungsprozess ist, der sowohl früh, als auch spät durch Nährstoffe und Signaltransduktionswege beeinflusst wird.

Es ist bekannt, dass die cAMP-Level während der Sporulation fluktuieren (Uno *et al.*, 1985; Watson and Berry, 1977). In einer von Uno *et al.* 1985 durchgeführten Studie wurde die cAMP-Konzentration während der Meiose untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die cAMP-Konzentration vor der Initiation der Meiose gering ist. Kurz nach Initiation der Meiose nimmt die cAMP-Konzentration in den Zellen wieder zu um im späteren Verlauf der Meiose auf einem konstanten Level zu bleiben. Diese Studie deutet darauf hin, dass die Zelle in der Lage sein muss die PKA-Aktivität zu modulieren. Ähnliches wurde in einer Studie von McDonald *et al.* postuliert. Die Autoren schlagen ein Modell vor, in dem mittelhohe PKA-Aktivität die Kinase Smk1 inhibiert. Ein weiteres Absinken der PKA-Aktivität zum Ende der Meiose führt dann zur Aktivierung von Smk1 (McDonald *et al.*, 2009). Auch dies deutet daraufhin, dass die Modulation der PKA-Aktivität während der Meiose wichtig ist.

Die Sporulation der *cyr1*-Mutanten *cyr1<sup>K1712A</sup>* und *cyr1<sup>K1876M</sup>* hat gezeigt, dass die Sporenzahl in beiden Mutanten nicht reguliert wurde (Abbildung 22). Bei der



*cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutante ist davon auszugehen, dass sie dauerhaft nur wenig cAMP produziert. Die durchgeführte Jodfärbung unterstützt diese Vermutung (Abbildung 21). Die Mutante könnte zwar noch in der Lage sein, unterschiedliche cAMP-Mengen zu produzieren und damit eine Modulation der PKA-Aktivität zu bewirken, wahrscheinlich erreicht die cAMP-Konzentration aber nicht das für eine erfolgreiche Regulation nötige Level. Im Gegensatz zur *cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutante produziert die *cyrI*<sup>K1876M</sup>-Mutante nur basale cAMP-Mengen (Vanhalewyn *et al.*, 1999). Auch diese Mutante zeigte eine gestörte Regulation der Sporenzahl und sporulierte vergleichbar mit der *cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutante (Abbildung 22). Dies zeigt, dass für die Regulation der Sporenzahl zum Einen eine bestimmte PKA-Aktivität benötigt wird, zum Anderen aber auch die Modulation der PKA-Aktivität eine Rolle spielt. Ebenfalls wird durch die Sporulation der *cyrI*<sup>K1712A</sup>- und der *cyrI*<sup>K1876M</sup>-Mutante deutlich, dass die Verstoffwechslung von Acetat nicht allein über die Zahl der gebildeten Sporen entscheidet. Beide Mutanten hatten ein unterschiedliches Alkalisierungsverhalten, aber einen ähnlichen Sporulationsphänotyp (Abbildung 22 und 24). Dies zeigt, dass die verringerte PKA-Aktivität in der *cyrI*<sup>K1712A</sup>-Mutante, beziehungsweise die gestörte Modulation der cAMP-Produktion in der *cyrI*<sup>K1876M</sup>-Mutante einen größeren Einfluss auf die Regulation der Sporenzahl haben als die Verstoffwechslung von Acetat. Ebenso ist es denkbar, dass die Verstoffwechslung von Acetat und Bildung von Bicarbonat in den *cyrI*-Mutanten kein Signal mehr generiert, da die mutierte Form von Cyr1 dieses nicht mehr wahrnehmen kann.

Neben der Modulation der PKA-Aktivität ist die genaue zeitliche Koordinierung der PKA-Aktivität wichtig. Dies wird zum Einen erneut dadurch deutlich, dass sich die cAMP-Konzentration während bestimmter Phasen des meiotischen Zellzyklus ändert, zum Anderen zeigen auch in dieser Arbeit durchgeführte Experimente die Bedeutung der zeitlichen Koordinierung der PKA-Aktivität. Wurde der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg durch Expression des *RAS2*<sup>G19V</sup>-Allels unter Kontrolle zeitlich unterschiedlich regulierter, Meiose-spezifischer Promotoren aktiviert, ergaben sich daraus phänotypische Unterschiede (Abbildung 15). Die Expression von *RAS2*<sup>G19V</sup> entspricht im Bezug auf die phänotypischen Konsequenzen einer Zugabe von Glukose (Wang *et al.*, 2004). Der Sporulationsdefekt der Mutante mit *RAS2*<sup>G19V</sup> unter Kontrolle des endogenen *RAS2*-Promotors ist dadurch zu erklären, dass die durch das *RAS2*<sup>G19V</sup>-Allel hervorgerufene hohe PKA-Aktivität den Eintritt in die Meiose inhibiert (Marshall *et al.*, 1987). In einer Studie von Friedlander *et al.* wurde untersucht, welche

transkriptionellen Konsequenzen die Zugabe von proliferationsförderndem Medium zu Zellen hat, die sich in zeitlich verschiedenen Phasen der Meiose befinden. Aus dieser Studie ist bekannt, dass die Zugabe eines solchen Mediums vor dem Zeitpunkt des *commitments* zu einem Abbruch der Meiose und einer Rückkehr zum vegetativen Wachstum führt (Friedlander *et al.*, 2006; Simchen, 2009). Die Expression von  $RAS2^{G19V}$  unter Kontrolle des *RAS2*- oder *IME2*-Promotors spiegelt dieses Experiment wieder, es gleicht einer Zugabe von proliferationsförderndem Medium vor dem Zeitpunkt des *commitments* und erklärt damit den Sporulationsdefekt. Es wurde ebenfalls der *SPSI*-Promotor zur Expression von  $RAS2^{G19V}$  verwendet, der zeitlich nach dem *commitment* aktiv ist (Chu *et al.*, 1998; Primig *et al.*, 2000). In diesem Fall zeigte sich, dass das meiotische Programm nicht abgebrochen wurde, die Sporulation aber im Vergleich zum Kontrollstamm negativ beeinträchtigt war (Abbildung 15).

Insgesamt zeigen die Experimente, dass die Verringerung der PKA-Aktivität zu einer allgemeinen Erhöhung, und die Erhöhung der PKA-Aktivität zu einer allgemeinen Verringerung der Sporenzahl führten. Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg übt also einen negativen Einfluss auf die Sporenbildung aus. Bei hohen Kaliumacetatkonzentrationen würde niedrige PKA-Aktivität zu einer erhöhten Sporenzahl führen, während bei niedrigen Kaliumacetatkonzentrationen die PKA-Aktivität steigt, damit die Sporenbildung negativ beeinflusst und so zu einer Verringerung der Sporenzahl führt.

### 3.4 Die PKA-Aktivität beeinflusst Zell- und Ascusgröße

In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der Zell- und Ascusgröße für *cyr1<sup>K1712A</sup>*-Mutanten beobachtet werden (Abbildung 23). Eine Erhöhung der Zellgröße wurde bereits für Mutanten beschrieben, in denen der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg durch Expression von  $RAS2^{G19V}$  konstitutiv aktiviert wurde. Konstitutiv geringe PKA-Aktivität, hervorgerufen durch Expression einer mutierten Version des Ras-GEFs *CDC25* führten hingegen zu einer verringerten Zellgröße (Baroni *et al.*, 1989; Belotti *et al.*, 2006). Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg reguliert die Zellgröße durch Beeinflussung der Ribosomenbiogenese und der START-Phase des Zellzyklus (Zaman *et al.*, 2008). Beim Wachstum und der Teilung müssen Zellen eine kritische Größe erreichen, bevor sie die START-Phase des Zellzyklus, während der späten G1-Phase, passieren können (Hartwell *et al.*, 1974; Johnston *et al.*, 1977). Es ist nicht bekannt ob

die kritische Zellgröße durch das Zellvolumen, den Protein- oder RNA-Gehalt der Zelle oder die Rate der Protein- oder Ribosomensynthese bestimmt wird (Jorgensen and Tyers, 2004). Neuere Studien deuten allerdings daraufhin, dass die Regulation der Ribosomenbiogenese und der Expression ribosomaler Proteine eine Rolle bei der Festlegung der kritischen Zellgröße spielen (Jorgensen *et al.*, 2002). Diese Prozesse werden vom cAMP/PKA- und vom TOR-Signaltransduktionsweg positiv reguliert (Fingerman *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2004; Marion *et al.*, 2004). Entgegen der Erwartungen führte eine direkte Störung der Ribosomenbiogenese aber nicht zu einer Verringerung, sondern zu einer Erhöhung der Zellgröße (Bernstein *et al.*, 2007).

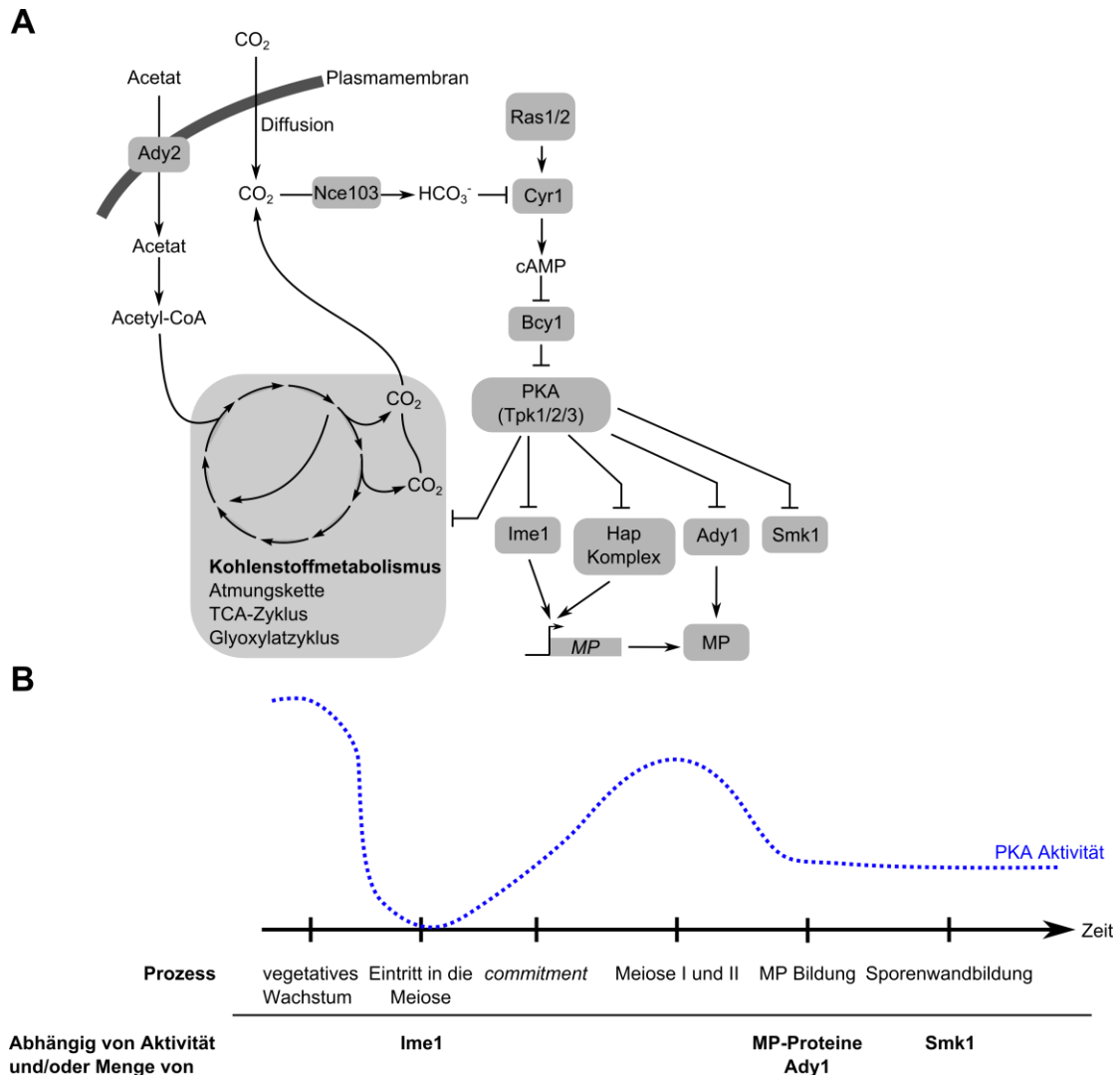
In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung der Zellgröße in *cyr1<sup>K1712A</sup>*-Mutanten, in denen die PKA-Aktivität gering ist (Abbildung 21), beobachtet werden (Abbildung 23). Dies widerspricht Ergebnissen, die in der Vergangenheit durch Manipulation von Ras2 oder des Ras-GEFs Cdc25 erhalten wurden (Baroni *et al.*, 1989; Belotti *et al.*, 2006). Ras2 beeinflusst neben dem cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg auch die Aktivität des Cdc42/Ste20-Map-Kinase-Signaltransduktionsweges, der in haploiden Zellen das haploid invasive Wachstum, in diploiden Zellen hingegen das Pseudohyphenwachstum reguliert (Chen and Thorner, 2010; Mosch *et al.*, 1999; Mosch *et al.*, 1996; Pan *et al.*, 2000). Manipulationen an Ras2 oder am Ras-GEF Cdc25 verursachen also Änderungen sowohl am cAMP/PKA- als auch am Cdc42/Ste20-Map-Kinase-Signaltransduktionsweg. Die Manipulation von Cyr1 betrifft hingegen nur den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg und könnte erklären, warum dies zu unterschiedlichen phänotypischen Konsequenzen führt, da auf diese Weise nur ein Signaltransduktionsweg betroffen ist.

### **3.5 Modellvorstellung zur Regulation der Sporenzahl durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg**

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich folgendes Modell zur Regulation der Sporenzahl durch Bicarbonat und den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg aufstellen (Abbildung 29 A).

Acetat gelangt durch Ady2 in die Zelle, und wird zunächst in Acetyl-CoA umgewandelt. Acetyl-CoA wird durch den Glyoxylatzyklus weiter verstoffwechselt und resultiert in der Bildung von Succinat, das in den Mitochondrien durch den TCA-Zyklus weiter

verwertet wird. Eine weitere Möglichkeit ist die Umwandlung von Acetyl-CoA in Acetyl-Carnitin, das durch das *carnitine shuttle* System in die Mitochondrien gelangt.



**Abbildung 29: Modellvorstellung zur Regulation der Sporenzahl durch den cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg**

A) Hap-Komplex: Hap2/3/4/5-Komplex, MP (Mpc54, Mpc70, Spo74): Meiotische Platte Proteine oder Gene. Weitere Details zur Abbildung befinden sich im Text. B) Die Zeitskala zeigt wichtige Schlüsselprozesse während der Sporulation. Die blaue, gestrichelte Linie stellt schematisch den zeitlichen Verlauf der PKA-Aktivität während der Sporulation dar. Der Verlauf der PKA-Aktivität wurde aus Messungen der cAMP-Konzentration während der Sporulation abgeleitet (Uno *et al.*, 1985; Watson and Berry, 1977). Von PKA regulierte Proteine, die einen Einfluss auf die meiotischen Prozesse haben, sind im unteren Teil der Tabelle aufgeführt.

Dort wird die Carnitingruppe abgetrennt, das dabei entstehende Acetyl-CoA wird in den TCA-Zyklus eingespeist. Dabei entsteht CO<sub>2</sub>, das zum Einen spontan als Bicarbonat in Lösung geht, zum Anderen von der Carbonanhydrase Nce103 zu Bicarbonat umgewandelt wird. Weiterhin kann CO<sub>2</sub> durch passive Diffusion in die Zelle gelangen.

Der cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg übt während des vegetativen Wachstums und während der Sporulation einen negativen Einfluss auf den Glyoxylat- und TCA-Zyklus

aus. PKA-Aktivität reguliert Ime1 und den Hap-Komplex, die die Expression von MP-Proteinen positiv regulieren, negativ. Weiterhin könnte PKA-Aktivität den Aufbau der meiotischen Platte durch negative Beeinflussung von Ady1 beeinträchtigen. Sowohl die Regulation der MP-Proteinmenge als auch der Aufbau der meiotischen Platte haben einen Einfluss auf die Regulation der Sporezahl.

Die PKA-Aktivität wird während der Meiose durch die Ras-Proteine und Bicarbonat reguliert. Während Ras1 und Ras2 eine basale Cyr1-Aktivität sicherstellen, übt Bicarbonat einen negativen Einfluss auf Cyr1 aus. Wenn viel Acetat zur Verfügung steht, entsteht auch viel Bicarbonat (Dickinson *et al.*, 1983). Dies führt zu einer Inhibierung von Cyr1 und einer verringerten PKA-Aktivität, was Prozesse wie die Expression der MP-Gene oder den Ady1-abhängigen Aufbau der meiotischen Platte und damit die Sporenbildung begünstigt (Abbildung 29 B). Unter Acetatmangelbedingungen entsteht weniger Bicarbonat, folglich ist die PKA-Aktivität höher, die Sporenbildung wird durch negative Beeinflussung der oben genannten Prozesse beeinträchtigt. Auf diese Weise hat die Acetatverfügbarkeit einen direkten Einfluss auf die PKA-Aktivität und damit auf die Sporenbildung. Die cAMP-Konzentration ändert sich im Verlauf der Meiose. Man kann daraus schließen, dass sich auch die PKA-Aktivität ändert. Studien haben gezeigt, dass die cAMP-Konzentration während der meiotischen Teilungen ihr Maximum erreicht und danach wieder abfällt (Uno *et al.*, 1985). Vermutlich wird für den Prozess der MP-Bildung geringe PKA-Aktivität benötigt. In einer anderen Studie wurde bereits gezeigt, dass die PKA-Aktivität zur Aktivierung von Smk1, einer Kinase, die für die Sporenbildung essentiell ist, absinken muss (McDonald *et al.*, 2009).

PKA-Aktivität übt einen generellen Einfluss auf den Kohlenstoffmetabolismus aus, indem sie die mitochondrielle Atmungskapazität und Enzyme aus dem TCA- und Glyoxylatzyklus beeinflusst. Dadurch beeinflusst PKA-Aktivität die Produktion von CO<sub>2</sub> und Bicarbonat, wodurch eine Rückkopplungsschleife auf Cyr1 entsteht.

### 3.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten sprechen dafür, dass Bicarbonat während des vegetativen Wachstums einen positiven, während der Sporulation hingegen einen negativen Einfluss auf Cyr1 ausübt. Ein interessantes Experiment wäre die Bicarbonat-Sensitivität von Cyr1 durch Messung der cAMP-Konzentration *in vitro* zu bestimmen.

Eine wichtige Kontrolle wäre dabei die *cyr1*<sup>K1712A</sup>-Mutante, die sich theoretisch durch einen Verlust der Bicarbonat-Sensitivität auszeichnen sollte. Allerdings müssten dennoch weitere *in vivo* Experimente durchgeführt werden, da Bicarbonat die Aktivität von Cyr1 ebenfalls durch Pufferung des intrazellulären pH-Wertes beeinflussen könnte. Um den *in vivo* Einfluss von Bicarbonat während der Sporulation beurteilen zu können, müsste man ein bekanntes, Meiose-spezifisches PKA-Ziel, dessen Lokalisation sich ähnlich wie die von Msn2 und Msn4 abhängig von der PKA-Aktivität ändert, in An- und Abwesenheit von Bicarbonat beobachten. Um einen Einfluss des pH-Wertes auszuschließen, müsste das Experiment in gepuffertem Medium durchgeführt werden. So könnte die Frage geklärt werden, ob Cyr1 tatsächlich, je nach Lebenszyklusphase unterschiedlich von Bicarbonat beeinflusst wird.

Eine ebenso wichtige Frage ist, ob unterschiedliche Kaliumacetatkonzentrationen, wie vermutet einen Einfluss auf die PKA-Aktivität haben. Diese Frage könnten Messungen der cAMP-Konzentration bei unterschiedlichen Kaliumacetatkonzentrationen beantworten. Eine weitere Möglichkeit wäre ein Meiose-spezifisches PKA-Ziel zu finden, das je nach PKA-Aktivität zum Beispiel unterschiedliche Lokalisationen aufweist. Durch Beobachtung dieses PKA-Ziels bei verschiedenen Kaliumacetatkonzentrationen könnten dann indirekt Rückschlüsse auf die PKA-Aktivität in den Zellen gezogen werden.

Eine weitere interessante Frage ist, zu welchen Zeitpunkten PKA-Aktivität während der Sporulation benötigt wird. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Zeitpunkt als auch die Modulation der PKA-Aktivität einen entscheidenden Einfluss auf die Sporulation und Sporezahlkontrolle haben. In anderen Studien durchgeführte Messungen der cAMP-Konzentration während der Meiose lassen nicht direkt Rückschlüsse auf die PKA-Aktivität ziehen, da die Aktivierung der PKA durch cAMP vom Verhältnis des cAMP und des inhibitorischen Proteins Bcy1 abhängt. Um einzugrenzen, zu welchem Zeitpunkt oder Zeitpunkten des meiotischen Zellzyklus PKA-Aktivität benötigt wird, wäre es zum Beispiel möglich die Expression von *pTEV*<sup>+</sup> durch Meiose-spezifische Promotoren zu kontrollieren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Sporulation aktiviert werden. So könnte zum Beispiel die Auswirkung der Ras-Depletion zu verschiedenen Zeitpunkten des meiotischen Zellzyklus untersucht werden.

Eine globale Transkriptomanalyse könnte Aufschluss darüber geben, welche Auswirkungen eine Deaktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Sporulation auf die Expression wichtiger Meiose-spezifischer Gene hat. So könnten zum Beispiel die Transkriptmengen von *MPC54*, *MPC70* und *SPO74* und weiterer wichtiger Gene in Kontrollzellen und Ras-depletierten Zellen überprüft werden.

Ebenfalls wäre es interessant zu untersuchen, welcher Signaltransduktionsweg an der Regulation der meiotischen Teilungen verantwortlich ist. Es hat sich gezeigt, dass unterschiedliche Kaliumacetatkonzentrationen im Gegensatz zu Ras einen Einfluss auf die meiotischen Teilungen haben. Dies deutet daraufhin, dass die verfügbare Nahrung während der Meiose nicht nur vom cAMP/PKA-Signaltransduktionsweg wahrgenommen wird. Dementsprechend könnte man in der Zukunft versuchen den Signaltransduktionsweg zu identifizieren, der den Ablauf der meiotischen Teilungen in Abhängigkeit der verfügbaren Nahrung reguliert.

# 4 Material

## 4.1 Bezugsquellen von Chemikalien, Enzymen und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anderes angegeben, von CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D) und VWR INTERNATIONAL GMBH (Darmstadt, D) bezogen.

Chemikalien zur Herstellung von Lösungen, Puffern und Medien wurden von den Firmen MERCK KGaA (Darmstadt, D), CARL ROTH GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), FLUKA (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, D) und VWR INTERNATIONAL GmbH (Darmstadt, D) bezogen.

Restriktions- und Modifikationsenzyme wurden von der FERMENTAS GmbH (St. Leon-Rot, D) und NEW ENGLAND BIOLABS Inc. (Frankfurt, D) geordert. Als DNA-Größenstandards wurden „Gene Ruler 1 kb DNA Ladder“ und „Gene Ruler DNA ladder mix“ (FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot, D) verwendet. RNase A wurde von der METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D) bezogen.

„KOD-Hifi“-DNA-Polymerase stammte von NOVAGEN (MERCK KGaA, Darmstadt, D).

Synthetische Oligonukleotide wurden von METABION INTERNATIONAL AG (Martinsried, D) synthetisiert.

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das „Plasmid Mini Kit“, zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen das „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (QIAGEN GmbH, Hilden, D) oder das E.Z.N.A. Gel-Extraction-Kit (OMEGA BIO-TEK, Norcross, USA). Die Sequenzierungen erfolgten bei SEQUENCE LABORATORIES GmbH (Göttingen, D).

Antikörper wurden von SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY Inc. (CA, USA), SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, D) und CALBIOCHEM (MERCK KGaA, Darmstadt, D) produziert.

Es wurden Proteingelapparaturen und Geldokumentationsanlagen von der BIO-RAD LABORATORIES GmbH (München, D) verwendet.



Alle Zentrifugationen von Volumina bis 2 ml erfolgten in Zentrifugen der HERAEUS HOLDING GmbH (Hanau, D): Zentrifugationen bei Raumtemperatur erfolgten, sofern nicht anders angegeben, in einer Tischzentrifuge „Biofuge pico“, alle Zentrifugationen bei 4°C in einer Tisch-Kühlzentrifuge „Biofuge fresco“. Zentrifugationen von Volumina über 2ml wurden in einer Stand-Kühlzentrifuge „4K-15“ der SIGMA LABORZENTRIFUGEN GmbH (Osterode am Harz, D) durchgeführt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M (CARL-ZEISS AG, Oberkochen, D) benutzt. Das Mikroskop war mit einem Plan Apochromat Öl Objektiv (NA 1,4; ZEISS), einer Digitalkamera (HAMAMATSU) und einem GFP- und DAPI-Filter-Set (ZEISS) ausgerüstet. Zur Tetradendisektion wurde ein Nikon ECLIPSE 50i Mikroskop mit Mikromanipulator benutzt.

Labor-Verbrauchsmaterialien wurden von der SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, D) bezogen.

#### 4.1.1 Lösungen und Puffer

In Tabelle 1 finden sich verwendete Lösungen und Puffer. Wenn nicht anders angegeben, wurden sie mit deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) angesetzt

**Tabelle1: Lösungen und Puffer**

Name	Zusammensetzung
8 M Harnstoffpuffer	1 mM EDTA 100 mM Lithium-Acetat 40 % PEG4000 10 mM Tris auf pH 8,0 mit Essigsäure sterilfiltriert
Alkalischer Lysepuffer	7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 1,85 M Natriumhydroxid
Concanavalin-A	3 % (w/v) Concanavalin A
DNA Probenpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 0.03 % (w/v) Bromphenolblau 0.03 % (w/v) Xylencyanol FF 0.15 % (w/v) Orange G 60 % (v/v) Glycerin 60 mM EDTA
ECL-Lösung	100 mM Tris HCl pH 9,2 2,5 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol)

	0,45 mM p-Cumarsäure 6,2 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Hoechst 33342-Lösung	1 µg/ml Hoechst 33342 in 50 % Glycerin
LiPEG	1 mM EDTA 100 mM Lithium-Acetat 40 % PEG4000 10 mM Tris auf pH 8,0 mit Essigsäure sterilfiltriert
LiSORB	1 mM EDTA 100 mM Lithium-Acetat 1 M Sorbitol 10 mM Tris auf pH 8,0 mit Essigsäure sterilfiltriert
Lösung 1 (Plasmidisolierung)	10 mM EDTA pH 8,0 50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0
Lösung 2 (Plasmidisolierung)	0,2 M NaOH 1 % (w/v) SDS
Lösung 3 (Plasmidisolierung)	5 M Kalium-Acetat 2 M Essigsäure
Lysepuffer	2 % (v/v) Triton X 1 % (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris Base pH 8 1 mM EDTA
Pfu-Puffer (10x)	200 mM Tris HCl pH 8,8 100 mM KCl 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1 % Triton X-100 1 mg/ml BSA
Ponceau S	1 % (w/v) Ponceau S 1 % (w/v) Essigsäure
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA pH 8,3
Taq-Puffer (10 x)	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl

	15 mM MgCl <sub>2</sub> pH 8,3
TBS	1,4 M NaCl 200 mM Tris Base pH 7,6
TBST	1,4 M NaCl 200 mM Tris Base pH 7,6 0,1 % (v/v) Tween 20
Transfer Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

#### 4.1.2 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Zur Herstellung von Festmedien wurden die Antibiotika nach Abkühlen des Agars auf 60 °C zugegeben.

**Tabelle2: Verwendete Antibiotika**

Name	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)
ClonNAT (Nourseothricin)	200 mg/ml	100 µg/ml	WERNER BIO AGENTS (Jena, D)
G418 (Genitacin)	200 mg/ml	200 µg/ml	CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)
Hygromycin B	50 mg/ml	300 µg/ml	CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)
Phleomycin	20 mg/ml	7,5 µg/ml	INVIVOGEN (Toulouse, France)

#### 4.1.3 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden mit dH<sub>2</sub>O angesetzt. Für Festmedien wurde 2 % Agar zugegeben. Bei der Herstellung von 5-FOA und SC-Festmedium wurde 4 % Agar und 2-fach konzentriertes SC-, beziehungsweise 5-FOA-Medium getrennt voneinander autoklaviert und nach dem Autoklavieren zusammen gegeben. 5-FOA wurde erst nach dem Autoklavieren des Mediums zugegeben.

**Tabelle3: Verwendete Nährmedien**

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
5-FOA-Medium (5-Fluorootic Acid)	0,2 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat 0,2 % (w/v) Aminosäuremischung ohne Uracil 0,005 % (w/v) Uracil 0,1 % (w/v) 5-FOA (Zugabe nach Autoklavieren)
LB-Medium (Lysogeny Broth)	1 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
LFM-Medium (Low Fluorescent)	10 % (v/v) Salz-Stammlösung 0,1 % (v/v) Spurenelemente-Stammlösung 0,1 % (v/v) Vitamin-Stammlösung
Salz-Stammlösung	5 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 % (w/v) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,5 % (w/v) $\text{MgSO}_4$ 0,1 % (w/v) NaCl 0,1 % (w/v) $\text{CaCl}_2$
SC-4-Medium (Synthetic Complete ohne Uracil, Leucin, Tryptophan und Histidin)	0,15 % (w/v) Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat 0,2 % (w/v) Aminosäuremischung
SPO-Medium (Sporulationsmedium)	1 %, 0,1 % oder 0,01 % KOAc in $\text{dH}_2\text{O}$
Spurenelemente-Stammlösung	0,05 % (w/v) $\text{H}_3\text{BO}_4$ 0,004 % (w/v) $\text{CuSO}_4$ 0,01 % (w/v) KI 0,02 % (w/v) $\text{FeCl}_3$ 0,04 % (w/v) $\text{MnSO}_4$ 0,02 % (w/v) $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ 0,04 % (w/v) $\text{ZnSO}_4$
Vitamin-Stammlösung	0,0002 % (w/v) Biotin 0,04 % (w/v) Calcium Pantothenat 0,2 % (w/v) Inositol 0,04 % (w/v) Niacin 0,02 % (w/v) Para-amino Benzoat 0,04 % (w/v) Pyridoxin HCl 0,04 % (w/v) Thiamin HCl
YP-Medium (Yeast extract, Peptone)	2 % (w/v) Pepton aus tryptisch verdaulichem Casein 1 % (w/v) Hefeextrakt

---

je nach gewünschter Kohlenstoffquelle wurde  
nach dem Autoklavieren zugesetzt:

- 2 % Glukose
- 1 % KOAc
- 2 % Raffinose
- 3 % Glycerin

---

### Aminosäuremischung

- Je 20 g:
  - Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glycin, Inositol, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Theronin, Tyrosin, Valin.
- 5g Adenin
- 2 g para-Aminobenzoesäure

Zu 36,7 g der Aminosäuremischung wurde zur Herstellung des entsprechenden SC-Mediums 2g Histidin, Uracil, Tryptophan oder 4 g Leucin gegeben.

## 4.2 Stämme und Plasmide

### 4.2.1 *E. coli* Stämme

**Tabelle4: Verwendete *E. coli* Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> <i><math>\Phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), <math>\lambda</math>-</i>	(Hanahan, 1983)
TOP10	F-, <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) <i><math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>lacX74 recA1, araD139 <math>\Delta</math> (araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)

### 4.2.2 *S. cerevisiae* Stämme

In der Folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae* Stämme aufgeführt. Für Genfusionen und Gendeletionen wurde eine PCR basierte Methode verwendet (Janke *et al.*, 2004). Wenn nicht anders angegeben, wurden Hefestämme aus dem genetischen SK1-Hintergrund verwendet. Die Überprüfung der genomischen

Veränderungen in den Hefestämmen erfolgte durch PCR und gegebenenfalls Tetradendisektion. Für die Tetradendisektion wurden die Hefestämme sporuliert und die vier aus einem Ascus entstandenen Sporen mittels Mikromanipulation auf YPD-Platten ausgelegt. Nach dem Wachstum der Sporen wurden diese auf entsprechende Selektionsplatten replikaplatziert um die Verteilung der genetischen Marker zu überprüfen. Tetradendisektion diente auch der Herstellung haploider Hefestämme, zum Beispiel nach Transformation eines PCR-Produktes in einen diploiden Hefestamm. Die Überprüfung des Paarungstyps erfolgte entweder durch PCR oder durch Kreuzung mit den Paarungstypsteststämmen YR312 und YR320. Hefestämme, die für Depletionsexperimente verwendet wurden, enthielten zusätzlich zur im Genom integrierten *pTEV<sup>+</sup>* das 2 $\mu$ -Plasmid pDS37 (*P<sub>IME2</sub>-pTEV<sup>+</sup>*), um die Menge an TEV-Protease zu erhöhen. Ein Teil der aufgelisteten Stämme wurde in Zusammenarbeit mit Daniela Störmer hergestellt.

**Tabelle5: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme**

Name	Genotyp	Referenz
ESM356	S288C, <i>MAT<sub>ura3-52 lys2-801 trp1</sub></i> $\Delta$ 63 <i>his3</i> $\Delta$ 200 <i>leu2</i> $\Delta$ 1GAL+	(Pereira <i>et al.</i> , 2001)
YAM281	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> YKS32 <i>MPC70-yeGFP::kanMX/MPC70-yeGFP::kanMX</i>	(Taxis <i>et al.</i> , 2005)
YCT1193	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> YKS32 <i>MSN2-GFP::kanMX/MSN2-GFP::kanMX</i>	Stammsammlung C. Taxis
YCT730	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> YKS32 <i>MPC54-yeGFP::kanMX/MPC54-yeGFP::kanMX</i>	(Taxis <i>et al.</i> , 2005)
YCT775	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> YKS32 <i>mpc54</i> $\Delta$ :: <i>kanMX/MPC54 mpc70</i> $\Delta$ :: <i>kanMX/MPC70 spo74</i> $\Delta$ :: <i>kanMX/SPO74</i>	(Taxis <i>et al.</i> , 2005)
YCT829	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> <i>ady2</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1/ady2</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1</i> <i>MNN1::Pykl50::GFP/MNN1</i>	Stammsammlung C. Taxis
YDS57	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> <i>loxP::klURA3::loxP::GFP-TDegF-3HA-TPK2/TPK2</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in den Stamm YMJ70: Primer: TPK2-S1, TPK2-S4; Template: pMJ13. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern TPK2-Tag und <i>hiskantag2</i> überprüft.		
YKS32	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> <i>lys2/lys2 ura3/ura3 leu2/LEU2 ho::hisG/ho::LYS</i>	(Knop and Strasser, 2000)
YMJ36	YKS32 <i>MAT<math>\alpha</math></i>	Diese Arbeit
YMJ37	YKS32 <i>MAT<math>\alpha</math></i>	Diese Arbeit
YMJ45	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1/RAS1</i>	Diese Arbeit
Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YKS32: Primer: RAS1-S1, RAS1-S4; template pCT289. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern RAS1-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.		
YMJ46	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2/RAS2</i>	Diese Arbeit
Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YKS32: Primer: RAS2-S1, RAS2-S4; template pCT289. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern RAS2-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.		
YMJ47	<i>MAT<math>\alpha</math></i>	Diese Arbeit

	<i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i>	
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ45.	
YMJ50	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ46.	
YMJ60	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b>  <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2/ADY1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in den Stamm YKS32: Primer: ADY1-S1, ADY1-S2; Template: pKS134. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern ADY1-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ61	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2/ADY1</i> <i>MPC54-yeGFP::kanMX/MPC54-yeGFP::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YCT730: Primer: ADY1-S1, ADY1-S2; Template pKS134. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern ADY1-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ62	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion des Stammes YMJ60.	
YMJ63	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ60.	
YMJ64	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady2<math>\Delta</math>::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion des Stammes YCT829.	
YMJ65	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady2<math>\Delta</math>::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion des Stammes YCT829.	
YMJ66	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2</i> <i>MPC54-yeGFP::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ61	
YMJ67	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2</i> <i>MPC54-yeGFP::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ61	
YMJ68	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2/ady1<math>\Delta</math>::natNT2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ62 und YMJ63.	
YMJ69	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady2<math>\Delta</math>::hphNT1/ady2<math>\Delta</math>::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ64 und YMJ65.	
YMJ70	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX /URA3</i>	Diese Arbeit
	Das Plasmid pMJ11 wurde mit den Restriktionsenzymen <i>ApaI</i> und <i>ApaLI</i> aufgeschnitten und in den Stamm YKS32 transformiert. Die Integration von <i>P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> erfolgte durch homologe Rekombination in den <i>URA3</i> -Lokus. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern <i>klURA3_rev</i> und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ71	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i>	Diese Arbeit

	<i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ47 und YMJ50 und Tetradendisektion.	
YMJ72	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ47 und YMJ50.	
YMJ73	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1<math>\Delta</math>::natNT2/ady1<math>\Delta</math>::natNT2</i> <i>MPC54-yeGFP::kanMX/MPC54-yeGFP::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ66 und YMJ67	
YMJ76	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ70.	
YMJ77	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ70.	
YMJ79	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX/ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	(Jungbluth <i>et al.</i> 2010)
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ76 und YMJ77.	
YMJ80	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ71 und YMJ77 und Tetradendisektion.	
YMJ81	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX/URA3</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1/ natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2/ natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ80 und YMJ72.	
YMJ82	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX / ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1/RAS</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung einer haploiden Spore aus der Kreuzung der Stämme YMJ71xYMJ77 (Spore enthielt <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> und <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> ) mit YMJ77.	
YMJ83	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ81.	
YMJ84	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ81.	
YMJ85	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX / ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1/natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-</i>	Diese Arbeit



	<i>TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2/natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ83 und YMJ84.	
YMJ90	<b>MATa/MATa</b> <i>natNT2::P<sub>CYCI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1/CYR1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YKS32: Primer: CYR1-S1, CYR1-S4; Template: pMJ9. Die Integration des PCR-Produktes wurde mit den Primern CYR1-KO und hiskantag2 überprüft.	
YMJ91	<b>MATa/MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1/BCY1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX/ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ79: Primer: BCY1-S1, BCY1-S4; Template pCT289. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern BCY1-KO und hiskantag2 überprüft.	
YMJ92	<b>MATa/MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1/CYR1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX / ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ79: Primer: CYR1-S1, CYR1-S4; Template: pCT289. Die Integration des PCR-Produktes wurde mit den Primern CYR1-KO und hiskantag2 überprüft.	
YMJ93	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ91.	
YMJ94	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ91.	
YMJ95	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ92	
YMJ96	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ92	
YMJ99	<b>MATa/MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1/ natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX / ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ93 und YMJ94.	
YMJ101	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>CYCI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ90	
YMJ102	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>CYCI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ90	
YMJ114	<b>MATa</b> <i>MPC70-yeGFP::kanMX</i>	Diese Arbeit

	Hergestellt durch Tetradendisektion von YAM281	
YMJ116	<b>MATa</b> <i>SPO74-yeGFP::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YUK63.	
YMJ117	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>CYCI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ102 und YMJ76und Tetradendisektion	
YMJ118	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>CYCI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ101 und YMJ76 und Tetradendisektion.	
YMJ121	<b>MATa/MATa</b> <i>natNT2::P<sub>CYCI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1/ natNT2::P<sub>CYCI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX / ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ117 und YMJ118	
YMJ123	<b>MATa/MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1/ natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-CYR1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX / ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ95 und YMJ96	
YMJ124	<b>MATa/MATa</b> <i>cyr1Δ::hphNT1/CYR1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YKS32: Primer: CYR1-S1, CYR1-S2; Template: pKS133. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern CYR1-KO und hiskantag2 überprüft.	
YMJ126	<b>MATa/MATa</b> <i>nce103Δ::hphNT1/NCE103</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YKS32: Primer: NCE103-S1, NCE103-S2; Template pKS133. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern NCE103-KO und hiskantag2 überprüft.	
YMJ130	<b>MATa</b> <i>nce103Δ::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ126.	
YMJ131	<b>MATa</b> <i>nce103Δ::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ126.	
YMJ132	<b>MATa/MATa</b> <i>nce103Δ::hphNT1/nce103Δ::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ130 und YMJ131.	
YMJ133	<b>MATa</b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ81.	
YMJ134	<b>MATa</b> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>	Diese Arbeit

	Hergestellt durch Tetradendissektion von YMJ81.	
YMJ135	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2</i> <i>SPO74-yeGFP</i> :: <i>kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendissektion nach Kreuzung von YMJ116 und YMJ63.	
YMJ136	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2</i> <i>SPO74-yeGFP</i> :: <i>kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendissektion nach Kreuzung von YMJ116 und YMJ63.	
YMJ137	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2</i> <i>MPC70-yeGFP</i> :: <i>kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendissektion nach Kreuzung von YMJ114 und YMJ63.	
YMJ138	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2</i> <i>MPC70-yeGFP</i> :: <i>kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendissektion nach Kreuzung von YMJ114 und YMJ63.	
YMJ143	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1</i> pMJ15 [ <i>CYR1 URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation des Plasmides pMJ15 in YMJ124 und anschließender Tetradendissektion.	
YMJ144	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1</i> pMJ15 [ <i>CYR1 URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation des Plasmides pMJ15 in YMJ124 und anschließender Tetradendissektion.	
YMJ145	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1</i> pDS66 [ <i>cyr1</i> <sup>K1712A</sup> <i>URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation des Plasmides pDS66 in YMJ124 und anschließender Tetradendissektion.	
YMJ146	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1</i> pDS66 [ <i>cyr1</i> <sup>K1712A</sup> <i>URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation des Plasmides pDS66 in YMJ124 und anschließender Tetradendissektion.	
YMJ147	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1/cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1</i> pMJ15 [ <i>CYR1 URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ143 und YMJ144.	
YMJ151	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1/cyr1</i> $\Delta$ :: <i>hphNT1</i> pDS66 [ <i>cyr1</i> <sup>K1712A</sup> <i>URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ145 und YMJ146.	
YMJ152	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2/ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2</i> <i>MPC70-yeGFP</i> :: <i>kanMX/MPC70-yeGFP</i> :: <i>kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ137 und YMJ138	
YMJ153	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2/ady1</i> $\Delta$ :: <i>natNT2</i> <i>SPO74-yeGFP</i> :: <i>kanMX/SPO74-yeGFP</i> :: <i>kanMX</i>	Diese Arbeit

	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ135 und YMJ136.	
YMJ158	<b>MATa/MATa</b> <i>IME2-9Myc::hphNT1/IME2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YKS32: Primer: IME-S2, IME2-S3; Template:pym20.	
YMJ159	<b>MATa/MATa</b> <i>P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2/ P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX/ ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Zur Herstellung des Stammes wurde das Plasmid pSH65 in den Stamm YDS57 transformiert. Die Selektion erfolgte auf YP-Agarplatten, die 2 % Galaktose (Induktion der Cre-Rekombinase) und 7,5 µg/ml Phleomycin (Selektion auf pSH65) enthielten. Die Transformationsplatten wurden auf 5-FOA-Agarplatten replikaplatziert um Klone zu Erhalten, in welchen das <i>klURA3</i> -Gen durch die Cre-Rekombinase entfernt wurde. Die erhaltenen Klone wurden mehrmals auf YPD-Platten umgestrichen um anschließend durch Replikaplatzierung der Zellen auf YPD-Platten mit 7,5 µg/ml Phleomycin Klone zu erhalten, die das pSH65-Plasmid verloren haben. Da die Bestimmung des Paarungstyps der haploiden Sporen nicht erfolgreich war, wurden mehrere haploide Sporen miteinander gekreuzt.	
YMJ160	<b>MATa/MATa</b> <i>ady1Δ::natNT2/ady1Δ::natNT2</i> <i>mpc54Δ::kanMX/MPC54</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ68: Primer: MPC54-S1, MPC54-S2; Template pFA6a-kanMX6. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern MPC54-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ161	<b>MATa/MATa</b> <i>ady1Δ::natNT2/ady1Δ::natNT2</i> <i>spo74Δ::kanMX/SPO74</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ68: Primer: SPO74-S1, SPO74-S2; Template pFA6a-kanMX6. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern SPO74-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ162	<b>MATa/MATa</b> <i>ady1Δ::natNT2/ady1Δ::natNT2</i> <i>mpc70Δ::kanMX/MPC70</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ68: Primer: MPC70-S1, MPC70-S2; Template pFA6a-kanMX6. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern MPC70-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ163	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1</i> <i>IME2-9Myc::hphNT1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in den Stamm YMJ93: Primer: IME2-S2, IME2-S3; Template: pYM20. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern IME2-Tag und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ164	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1</i> <i>IME2-9Myc::hphNT1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in den Stamm YMJ94: Primer: IME2-S2, IME2-S3; Template: pYM20. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern IME2-Tag und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ165	<b>MATa</b> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i> <i>IME2-9Myc::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ133: Primer:IME2-S2, IME2-S3; template: pYM20. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern IME2-Tag und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ166	<b>MATa</b>	Diese Arbeit

	<p><i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i>  <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i>  <i>IME2-9Myc::hphNT1</i></p> <p>Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ134: Primer:IME2-S2, IME2-S3; template: pYM20. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern IME2-Tag und hiskantag2 überprüft.</p>	
YMJ168	<p><b>MATa</b>  <i>IME2-9Myc::hphNT1</i></p> <p>Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ158.</p>	Diese Arbeit
YMJ169	<p><b>MATa</b>  <i>IME2-9Myc::hphNT1</i></p> <p>Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ158.</p>	Diese Arbeit
YMJ171	<p><b>MATa</b>  <i>P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2</i>  <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i></p> <p>Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ159.</p>	Diese Arbeit
YMJ174	<p><b>MATa</b>  <i>ady2Δ::natNT2</i>  <i>cyr1Δ::hphNT1</i>  <pds66 [<i="">cyr1<sup>K1712A</sup> URA3 ARS/CEN]</pds66></p> <p>Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ145: Primer: ADY2-S1, ADY2-S2; Template pKS134. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern ADY2-KO und hiskantag2 überprüft.</p>	Diese Arbeit
YMJ175	<p><b>MATa</b>  <i>ady2Δ::natNT2</i>  <i>cyr1Δ::hphNT1</i>  <pds66 [<i="">cyr1<sup>K1712A</sup> URA3 ARS/CEN]</pds66></p> <p>Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ146: Primer: ADY2-S1, ADY2-S2; Template pKS134. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern ADY2-KO und hiskantag2 überprüft.</p>	Diese Arbeit
YMJ176	<p><b>MATa</b>  <i>gpa2Δ::hphNT1</i></p> <p>Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ36: Primer: GPA2-S1, GPA2-S2; Template: pKS133. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern GPA2-KO und hiskantag2 überprüft.</p>	Diese Arbeit
YMJ177	<p><b>MATa</b>  <i>gpa2Δ::hphNT1</i></p> <p>Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ37: Primer: GPA2-S1, GPA2-S2; Template: pKS133. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern GPA2-KO und hiskantag2 überprüft.</p>	Diese Arbeit
YMJ179	<p><b>MATa/MATa</b>  <i>IME2-9Myc::hphNT1/IME2-9Myc::hphNT1</i></p> <p>Hergestellt durch Kreuzung von YMJ168 und YMJ169.</p>	Diese Arbeit
YMJ180	<p><b>MATa/MATa</b>  <i>gpa2Δ::hphNT1/gpa2Δ::hphNT1</i></p> <p>Hergestellt durch YMJ176 und YMJ177.</p>	Diese Arbeit
YMJ181	<p><b>MATa/MATa</b>  <i>ady2Δ::natNT2/ady2Δ::natNT2</i>  <i>cyr1Δ::hphNT1/cyr1Δ::hphNT1</i>  <pds66 [<i="">cyr1<sup>K1712A</sup> URA3 ARS/CEN]</pds66></p> <p>Hergestellt durch Kreuzung von YMJ174 und YMJ175.</p>	Diese Arbeit
YMJ182	<p><b>MATa</b>  <i>ady2Δ::natNT2</i>  <i>cyr1Δ::hphNT1</i></p>	Diese Arbeit

	pMJ15 [ <i>CYR1 URA3 ARS/CEN</i> ]	
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ143: Primer: ADY2-S1, ADY2-S2; Template: pKS133. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern ADY2-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ183	<b>MATa</b> <i>ady2Δ::natNT2</i> <i>cyr1Δ::hphNT1</i> pMJ15 [ <i>CYR1 URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ144: Primer: ADY2-S1, ADY2-S2; Template: pKS134. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern ADY2-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ184	<b>MATa/MATα</b> <i>ady2Δ::natNT2/ady2Δ::natNT2</i> <i>cyr1Δ::hphNT1/cyr1Δ::hphNT1</i> pMJ15 [ <i>CYR1 URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ182 und YMJ183.	
YMJ187	<b>MATa/MATα</b> <i>tpk3Δ::hphNT1/TPK3</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in den Stamm YKS32: Primer: TPK3-S1, TPK3-S2; Template: pKS133. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern TPK3-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ188	<b>MATa/MATα</b> <i>tpk1Δ::natNT2/TPK1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in den Stamm YKS32: Primer: TPK1-S1, TPK1-S2; Template: pKS133. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern TPK1-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ189	<b>MATa</b> <i>tpk1Δ::natNT2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ188.	
YMJ194	<b>MATα</b> <i>tpk3Δ::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Tetradendisektion von YMJ187.	
YMJ195	<b>MATa/MATα</b> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1/natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS1</i> <i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2/natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-3HA-RAS2</i> <i>IME2-9Myc::hphNT1/IME2-9Myc::hphNT1</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ165 und YMJ166.	
YMJ202	<b>MATa</b> <i>tpk1Δ::natNT2</i> <i>P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ171 und YMJ189 und Tetradendisektion.	
YMJ204	<b>MATα</b> <i>gpr1Δ::natNT2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ37: Primer: GPR1-S1, GPR1-S2; Template pKS134. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern GPR1-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ205	<b>MATa</b> <i>gpr1Δ::natNT2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation eines PCR-Produktes in YMJ36: Primer: GPR1-S1, GPR1-S2; Template pKS134. Die Integration des PCR-Produktes wurde durch eine Test-PCR mit den Primern GPR1-KO und <i>hiskantag2</i> überprüft.	
YMJ206	<b>MATa</b>	Diese Arbeit

	<i>tpk1Δ::natNT2</i> <i>tpk3Δ::hphNT1</i> <i>P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	
	Hergestellt durch Tetradendisektion nach Kreuzung von YMJ194 und YMJ202.	
YMJ207	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>tpk1Δ::natNT2</i> <i>tpk3Δ::hphNT1</i> <i>P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ194 und YMJ202.	
YMJ208	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>gpr1Δ::natNT2/gpr1Δ::natNT2</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ204 und YMJ205.	
YMJ209	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>tpk1Δ::natNT2/tpk1Δ::natNT2</i> <i>tpk3Δ::hphNT1/tpk3Δ::hphNT1</i> <i>P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2/P<sub>TPK2</sub>-GFP-TDegF-3HA-TPK2</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX/ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ206 und YMJ207.	
YMJ210	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1Δ::hphNT1</i> pMJ19 [ <i>cyr1<sup>K1876M</sup> URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation des Plasmides pMJ19 in YMJ124.	
YMJ215	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1Δ::hphNT1</i> pMJ19 [ <i>cyr1<sup>K1876M</sup> URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Transformation des Plasmides pMJ19 in YMJ124.	
YMJ215	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>cyr1Δ::hphNT1/cyr1Δ::hphNT1</i> pMJ19 [ <i>cyr1<sup>K1876M</sup> URA3 ARS/CEN</i> ]	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ210 und YMJ215.	
YMJ221	<b>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></b> <i>natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1/natNT2::P<sub>ADH1</sub>-GFP-TDegF-3HA-BCY1</i> <i>IME2-9Myc::hphNT1/IME2-9Myc::hphNT1</i> <i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX/ura3::P<sub>IME2</sub>-p14<sup>D122Y</sup>-TEV<sup>S219V 234STOP</sup>::kanMX</i>	Diese Arbeit
	Hergestellt durch Kreuzung von YMJ163 und YMJ164.	
YR312	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>his1</i> Haploider Hefestamm zur Überprüfung des Kreuzungstyps.	Stammsammlung C. Taxis
YR320	<b>MAT<math>\alpha</math></b> <i>his1</i> Haploider Hefestamm zur Überprüfung des Kreuzungstyps	Stammsammlung C. Taxis
YUK63	YKS32 <i>SPO74-yeGFP::kanMX/SPO74-yeGFP::kanMX</i>	(Taxis <i>et al.</i> , 2005)

### 4.2.3 Plasmide

**Tabelle6: Verwendete Plasmide**

Name	Genotyp und Herstellung	Referenz
B2255	<i>P<sub>RAS2</sub>-RAS2<sup>G19V</sup>,ARS/CEN,URA3, Amp<sup>R</sup></i>	(Mosch <i>et al.</i> , 1996)

BHUM1424	Suizidvektor pJET1.2 (2,97 kb; FERMENTAS, St. Leon-Rot, D) mit 1,2kb <i>EcoRV</i> -Fragment von <i>DON1</i> ( <i>Ustilago maydis</i> ) in Suizidgen <i>eco471R</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Stammsammlung H.-U. Mösch
pCR3	<i>P<sub>IME2</sub>::GFP-pTEV<sup>+</sup>::hphNT1, ARS/CEN, URA3, Amp<sup>R</sup></i>	Bachelorarbeit, C. Renicke, 2008
pCT262	<i>ura3::kanMX::Pcup1-1-p14<sup>DI22Y</sup>-TEV::ura3, Amp<sup>R</sup></i>	Stammsammlung C. Taxis
pCT266	<i>natNT2::PCYC1-GFP-TDegF, Amp<sup>R</sup></i>	Stammsammlung C. Taxis
pCT289	<i>natNT2::P<sub>ADHI</sub>-GFP-TDegF-SF3B-3HA, Amp<sup>R</sup></i>	(Taxis <i>et al.</i> , 2009)
pDS37	<i>P<sub>IME2</sub>-GFP-pTEV<sup>+</sup>, 2μ, URA3, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
pDS66	<i>cyr1<sup>K1712A</sup>, ARS/CEN, URA3, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Die K1712A Mutation wurde durch <i>Quickchange</i> Mutagenese mit den Primern CYR1-K1712A und CYR1-K1712A_rev in das Plasmid pMJ15 eingeführt. Nach der PCR wurde ein Restriktionsverdau mit <i>DpnI</i> durchgeführt um das methylierte, unmutierte, aus <i>E. Coli</i> stammende Plasmid zu zerstören. Durch die <i>Quickchange</i> Mutagenese wird eine <i>MscI</i>-Schnittstelle in das Plasmid eingeführt. Ein <i>MscI</i> Charakterisierungsverdau ergibt für pMJ15 die Bandengrößen 10226 und 2102 bp, für das mutierte <i>cyr1<sup>K1712A</sup></i>-Plasmid 10226, 1173 und 929 bp.</p>		
pFA6a-kanMX6	<i>kanMX6, Amp<sup>R</sup></i>	(Wach <i>et al.</i> , 1994)
pMJ1	<i>ura3::Pcup1-pTEV<sup>+</sup>::kanMX::ura3, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Zur Herstellung des Plasmides wurde eine <i>Quickchange</i> Mutagenese mit den Primern TEV234_stop und TEV234_stop_rev auf das Plasmid pCT262 durchgeführt.</p>		
pMJ9	<i>natNT2::P<sub>cyc1</sub>::GFP-TDegF-SF3B-3HA, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Der <i>CYC1</i>-Promotor wurde aus dem Plasmid pCT266 mit den Enzymen <i>SacI</i> und <i>XbaI</i> herausgeschnitten (291 bp). Anschließend wurde das entstandene Fragment in den mit <i>SacI</i> und <i>XbaI</i> geschnittenen Vektor pCT289 kloniert.</p>		
pMJ11	<i>ura3::P<sub>IME2</sub>-p14-pTEV<sup>+</sup>::kanMX::ura3, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Der <i>IME2</i>-Promotor wurde mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen <i>BamHI</i> und <i>BssHI</i> aus dem Plasmid pCR3 entfernt. Das Plasmid pMJ1 wurde ebenfalls mit <i>BamHI</i> und <i>BssHI</i> geschnitten. Das pCR3-<i>BamHI</i>-<i>BssHI</i> Fragment wurde anschließend in den <i>BamHI</i>, <i>BssHI</i> geschnittenen pMJ1-Vektor ligiert.</p>		
pMJ12	<i>loxP::klURA3:loxP::GFP-TDeg-SF3B-3HA, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Hergestellt durch Ligation eines 1176 bp großen <i>EcoRV</i>, <i>SpeI</i> Fragmentes von pMJ14 in ein 3916 bp großes <i>SpeI</i>, <i>HpaI</i> Fragmentes von pUG72</p>		
pJM13	<i>loxP::klURA3::loxP::GFP-TDegF-SF3B-3HA, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Zur Herstellung des Plasmides wurde eine <i>Quickchange</i> Mutagenese auf das Plasmid pMJ12 mit den Primern pMJ12_QC und pMJ12_QC_rev durchgeführt. Die <i>Quickchange</i> Mutagenese erzeugt in pMJ12 einen <i>Frameshift</i>, so dass das Konstrukt korrekt exprimiert wird.</p>		
pMJ14	<i>GFP-TDeg-SF3B-3HA, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Hergestellt durch Ligation eines PCR-Produktes in den mit <i>EcoRV</i> geschnittenen Suizidvektor BHUM1424: Primer: TDeg_up, TDeg_up_rev; Template: pCT289.</p>		
pMJ15	<i>CYR1, ARS/CEN, URA3, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
<p>Zur Herstellung des Plasmides wurde der gesamte <i>CYR1</i>-ORF und der <i>CYR1</i>-Promotor per PCR mit Hilfe der Primer CYR1_homrek und CYR1_homreg_rev von genomischer DNA des Hefestammes ESM356 Stammes amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels In-Hefe-Ligation in das Plasmid pRS316 ligiert. Das Plasmid wurde durch einen <i>BglII</i> Charakterisierungsverdau identifiziert, der für pRS316 die Bandengrößen 3196 und 1691 bp, für pMJ15 die Bandengrößen 7571, 3196 und 1561 bp ergibt.</p>		
pMJ16	<i>P<sub>SPS1</sub>-RAS2<sup>G19V</sup>, ARS/CEN, URA3, Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit



	Zunächst wurde der <i>SPS1</i> -Promotor mit den Primern SPS1-RAS2-drag-down und SPS2-RAS2-drag-up-rev von genomischer DNA des Hefestammes ESM356 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels in-Hefe-Ligation in das <i>EcoRI</i> und <i>Clal</i> geschnittene Plasmid B2255 ligiert. Ein Charakterisierungsverdau mit den Restriktionsenzymen <i>SacI</i> und <i>BamHI</i> ergibt für B2255 eine einzelne Bande (das Plasmid wird linearisiert) und für pMJ16 die Bandengrößen 7577, 1618 und 499 bp.	
pMJ17	$P_{IME2-RAS2}^{G19V}$ , <i>ARS/CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
	Zunächst wurde der <i>IME2</i> -Promotor mit den Primern IME2-RAS2-drag-down und IME2-RAS2-drag-up-rev von genomischer DNA des Hefestammes ESM356 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels in-Hefe-Ligation in das <i>EcoRI</i> und <i>Clal</i> geschnittene Plasmid B2255 ligiert. Ein Charakterisierungsverdau mit den Restriktionsenzymen <i>SacI</i> und <i>BamHI</i> ergibt für B2255 eine einzelne Bande (das Plasmid wird linearisiert) und für pMJ17 die Bandengrößen 7577, 1618 und 1374 bp.	
pMJ19	$cyr1^{K1876M}$ , <i>ARS/CEN</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	Diese Arbeit
	Die K1876M Mutation wurde durch <i>Quickchange</i> Mutagenese mit den Primern CYR1-K1876M-HindIII und CYR1-K1876M-HindIII _rev in das Plasmid pMJ15 eingeführt. Nach der PCR wurde ein Restriktionsverdau mit <i>DpnI</i> durchgeführt um das methylierte, unmutierte, aus <i>E. Coli</i> stammende Plasmid zu zerstören. Durch die <i>Quickchange</i> Mutagenese wird eine <i>HindI</i> -Schnittstelle in das Plasmid eingeführt. Ein <i>HindIII</i> Charakterisierungsverdau ergibt für pMJ15 die Bandengrößen 10302, 1995 und 31 bp, für das mutierte $cyr1^{K1876M}$ -Plasmid 7548, 2754, 1995 und 31 bp.	
pKS133	<i>hphNT1</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pKS134	<i>natNT2</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)
pRS316	<i>URA3</i> , <i>ARS/CEN</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pSH65	<i>GAL1-cre</i> , <i>ble<sup>R</sup></i>	(Guldener <i>et al.</i> , 1996)
pUG72	<i>loxP::klURA3::loxP</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	(Guldener <i>et al.</i> , 1996)
pYM20	<i>9MYC-hphNT1</i> , <i>Amp<sup>R</sup></i>	(Janke <i>et al.</i> , 2004)

#### 4.2.4 Oligonukleotide

In nachfolgender Tabelle finden sich die verwendeten Oligonukleotide.

**Tabelle7: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Verwendung	Sequenz in 5'-3'-Richtung
ADY1-KO	Test-PCR YMJ60	TAGCCAGACCAATTACGACG
ADY1-S1	Herstellung YMJ60	CTACCATAGTCAGTATTTTTGGGAATT TTATAAAAACGCAAATTTTATCGAAAT GCGTACGCTGCAGGTCGAC
ADY1-S2	Herstellung YMJ60	ATTATAATTCTACACAAAATTACATTT AAATATTAATGGCTTTCTTCAAATTC AATCGATGAATTTCGAGCTCG
ADY2-KO	Test-PCR YMJ174, YMJ175,	CGGTTGGGCGGCTATTTTCG

	YMJ182, YMJ183	
ADY2-S1	YMJ174, YMJ175, YMJ182, YMJ183	AACACAGATATAACTAAACAACCACA AAACAACATCATATACAAACAAATAAT ATGCGTACGCTGCAGGTCGAC
ADY2-S2	YMJ174, YMJ175, YMJ182, YMJ183	GAAAAATAAAAACTACTCTTTTTTAT TTCAATAGTTCTCGTTATTAGTAGGTC GTGCTCTTAATCGATGAATTCGAGCTC G
BCY1-KO	Test-PCR YMJ91	ACTGTGCTCGGATTCCGAC
BCY1-S1	Herstellung YMJ91	AACAAGCAGATTATTTTCAAAGACA ACAGTAAGAATAAACGATGCGTACGC TGCAGGTCGAC
BCY1-S4	Herstellung YMJ91	GAACAGTTGCAATTCGGCTTGCATTCC CTTGGGCAAAGAAGATACCATCGATG AATTCTCTGTCG
CYR1_homrek	Herstellung pMJ15	AGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTA GAACTAGTCAAAGTACGTAATTTTCTT AGTTT
CYR1_homrek_rev	Herstellung pMJ15	ATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGG GCCCCGTACGAGGAGATGAAACAACA TATTC
CYR1_K1712A	Herstellung pDS66	CGGTGGTTACGAAGTGGCCACAGAAG GAGACGCC
CYR1_K1712A_rev	Herstellung pDS66	GGCGTCTCCTTCTGTGGCCACTTCGTA ACCACCG
CYR1_K1876M_HindIII	Herstellung pMJ19	GGCGAGCATAAGCTTATGGGACTCGA AACCAAA
Cyr1_K1876M_HindIII_r ev	Herstellung pMJ19	TTTGGTTTCGAGTCCCATAAGCTTATG CTCGCC
CYR1-KO	Test-PCR YMJ90, YMJ92, YMJ124	GGAATGGCAGACTGAACTG

CYR1-S1	Herstellung YMJ90, YMJ92, YMJ124	ATGAAACGAGTAACAGGGTGGTACAT AATTTACGAACAGAACTCAATCGATGA ATTCGAGCTCG
CYR1-S2	Herstellung YMJ124	ATGAAACGAGTAACAGGGTGGTACAT AATTTACGAACAGAACTCAATCGATGA ATTCGAGCTCG
CYR1-S4	Herstellung YMJ90, YMJ92	TCGCTGAGGGCCAGAAATTTCCGAACC AGTATCAGGTTTTGATGACATCGATGA ATTCTCTGTCG
GPA2-KO	Test-PCR YMJ176, YMJ177	AAGTCCGCCAATTCAGTCAC
GPA2-S1	Test-PCR YMJ176, YMJ177	CAGCGAGCCTTATTGTTACAGCACAAA TCACGCGTATTTTCAAGCAAATATCAT GCGTACGCTGCAGGTCGAC
GPA2-S2	Test-PCR YMJ176, YMJ177	ATAATAAAGGGGAGAAGAGGCATGCA GTTTTGTCTCTGTTTTAGCTGTGCATTC AATCGATGAATTCGAGCTCG
GPR1-Ko	Test-PCR YMJ204, YMJ205	CCAGGTTTGAGCCGGACC
GPR1-S1	Herstellung YMJ204, YMJ205	TGATCCGAAGTGTGACGAATAAAGCA AACTCTCCAACTCAAATGCGTACGCT GCAGGTCGAC
GPR1-S2	Herstellung YMJ204, YMJ205	TCCTTACTTTCCATTTTCAAACATCGCG ATACAAAACTTTATAAATCGATGAAT TCGAGCTCG
hiskantag2	Test-PCRs in Verbindung mit Gen spezifischen TAG oder KO Primern	GCTGCGCACGTCAAGACTG
IME2-RAS2-drag-up_rev	Herstellung pMJ17	GACGACTAGCTTGTACTCTCTTATGTT CGACTTGTTCAAAGGCATGGATCCAAA TGACCTATTAAGTTAAGCTTA
IME2-RAS2-drag-down	Herstellung pMJ17	TTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACG AGGCCCTTTCGTCTTCAAGAGCTCGTA

		TAGCCTATCGGTTATTCG
IME2-S2	Herstellung YMJ163, YMJ164, YMJ165, YMJ166	GTATATAACTATATAACTGTGCCTAAC GATTCGTCAGTCAAATGACAAATTATT AATCGATGAATTCGAGCTCG
IME2-S3	Herstellung YMJ163, YMJ164, YMJ165, YMJ166	AAAGTTCGAGCCTCATCTATCCAATTC AAACCAACATTTTGGAAATGTAACCTT CCGTACGCTGCAGGTCGAC
IME2-TAG	Test-PCR YMJ163, YMJ164, YMJ165, YMJ166	GCGATTCGTTTAATTCAATGCC
klURA3_rev	Test-PCR YMJ70	CATCATTGTTGGCAGAGGAC
<i>MAT</i> alpha1	Bestimmung des <i>mating</i> <i>types</i> mittels PCR	TACTTCGAAGCCTGCTTTCA
<i>MAT</i> a1	Bestimmung des <i>mating</i> <i>types</i> mittels PCR	TCATCAATATCACCCCAAGC
MATrev	Bestimmung des <i>mating</i> <i>types</i> mittels PCR	GTGGAGGCACCCAAGAAG
MPC54-KO	Test-PCR YMJ160	AAGTGTGTGTTTTGTAAAGCC
MPC54-S1	Herstellung YMJ160	CTAAGATAAGTTGTTAGTCTCTGTAAC TTCTCGTATAAGGCCATGCGTACGCTG CAGGTCGAC
MPC54-S2	Herstellung YMJ160	CGAGCTCGAATTCATCGATTTAGGTTA TAAACCTTAATTGTTTGGTAAGTGAAC GAAATGCTCA
MPC70-KO	Test-PCR YMJ162	ATTTCTTTAGACTGGAAGTATC
MPC70-S1	Herstellung YMJ162	AAAGGCATATTAAGATCTATTAAG ATCTATTAAGCTTTCTGCTACCAGTA TGCGTACGCTGCAGGTCGAC
MCP70-S2	Herstellung YMJ162	TATGTATATATAGAATATTAAGGATTA TAAAAGAATGTGTAGCTGTTGAGGTTT AATCGATGAATTCGAGCTCG

NCE103-KO	Test-PCR YMJ126	GCTTTCTAACCATCACCCC
NCE103-S1	Herstellung YMJ126	AACTACAGCTAAGACTACAAATTTCAA TTATTACACATCAGAATGCGTACGCTG CAGGTCGAC
NCE103-S2	Herstellung YMJ126	TATTTCAATGAATATTATATAAGTATA TCGGTGAGGCTAAAATAATCGATGA ATTGAGCTCG
RAS1-KO	Test-PCR YMJ45	GCACAATGTAAACCCGTAGG
RAS1-S1	Herstellung YMJ45	CACGATTGAACAGGTAAACAAAATTTT CCCTTTTLAGAACGACATGCGTACGCT GCAGGTCGAC
RAS1-S4	Herstellung YMJ45	CGACAATACTATCTTATACTCTCTTAT AGTTGATTTATTTCCCTGCATCGATGA ATTCTCTGTGCG
RAS2-KO	Test-PCR YMJ46	ACATGACAGCAAAGACGAAAC
RAS2-S1	Herstellung YMJ46	CCAAGTTAACCGTTTTTCGAATTGAAAG GAGATATACAGAAAAAAAAAATGCGTA CGCTGCAGGTCGAC
RAS2-S4	Herstellung YMJ46	CCAACGACGACTAGCTTGTACTCTCTT ATGTTGACTTGTCAAAGGCATCGAT GAATTCTCTGTGCG
SPO74-KO	Test-PCR YMJ161	TTCGAGCCCCCTACAGGG
SPO74-S1	Herstellung YMJ161	ACTCTTCCCGTTATGTTGTATTGGCA AGGAAAGAGCTGAATTGGTTGAGTGA TGCGTACGCTGCAGGTCGAC
SPO74-S2	Herstellung YMJ161	TATGCAAGACATGTATATATGATTAGT AGTTTTTTTTTATTTACTTTTCATTGATCA ATCGATGAATTCGAGCTCG
SPS1-RAS2-drag-down	Herstellung pMJ16	TTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACG AGGCCCTTTCGTCTTCAAGAGCTCTGA TAATTTAACTGTATTTTTTTCC

SPS1-RAS2-drag-up_rev	Herstellung pMJ16	GACGACTAGCTTGTACTCTCTTATGTT CGACTTGTTCAAAGGCATGGATCCTTT GTGCTATTTTCTTTTGTTG
Tev234stop	Herstellung pMJ1	GAAGCGACTCAATTGTAAGGAATCCG GCGCATC
Tev234stop_rev	Herstellung pMJ1	GATGCGCCGGAATTCCTTACAATTGAG TCGCTTC
TPK1-KO	Test-PCR YMJ188	GGAAGGCGGGATCTGGTAA
TPK1-S1	Herstellung YMJ188	TAAGCAGTGCATGAATTATAGCTGATT GTGTGAAAGAATCTTTTTTTTGGGTAT GCGTACGCTGCAGGTCGAC
TPK1-S2	Herstellung YMJ188	ATATGAAAAAAAAAAAAATATAGATAC GAGAGGAAAATACAACAAACATTAG TCAATCGATGAATTCGAGCTCG
TPK2-S1	Herstellung YDS57	GCTTCACTCAGGTAACTCACATACTG TTGAAAATTGTCGGTATGCGTACGCTG CAGGTCGAC
TPK2-S4	Herstellung YDS57	CTGGATTGTTTGACCAACTGGCTGAGC CCTTTCTGCAACGAATTCCATCGATGA ATTCTCTGTCG
TPK2-KO	Test-PCR YDS57	GGAAATTAAGGGGGAGCGG
TPK3-Ko	Test-PCR YMJ187	ACGCATACTGGTGAACCACT
TPK3-S1	Herstellung YMJ187	TAATCATATTGTATATCGGTGGTTGTA CAAGGAAAGAGCGAGCCTGCACAAAA TGCGTACGCTGCAGGTCGAC
TPK3-S2	Herstellung YMJ187	TTTACTTTTATTGATTTTTTTTTTTTTTTC AATTACAATTATCCCACTGAACCTCCA TCGATGAATTCGAGCTCG

## 4.2.5 Antikörper

**Tabelle8: Primärantikörper**

Name	Verdünnung	Bezugsquelle
Mouse anti GFP	1:5000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES (Santa Cruz, USA)
Mouse anti HA	1:1000	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GMBH (Steinheim, D)
Rabbit anti TUB1	1:20000	Gabe von M. Knop an C. Taxis
Mouse anti Myc	1:1000	CELL SIGNALING (Danvers, MA, USA)

**Tabelle9: Sekundärantikörper**

Name	Verdünnung	Bezugsquelle
Goat anti rabbit igG	1:3000	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGIES (Santa Cruz, USA)
Goat anti mouse IgG	1:2000	JACKSON IMMUNORESEARCH EUROPE LTD.(Newmarket, UK)

## 4.2.6 Polyacrylamidgele

**Tabelle10: Verwendete Polyacrylamidgele**

	Trenngel	Trenngel	Sammelgel
	8 % Acrylamid	10 % Acrylamid	4 % Acrylamid
<b>30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)</b>	2,7 ml	3,4 ml	1,3 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,2 ml	2,5 ml	6,1 ml
<b>1 M Tris-HCl pH 8,8</b>	3,75 ml	3,75 ml	—
<b>0,5 M Tris-HCl pH 6,8</b>	—	—	2,5 ml
<b>10 % SDS</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>10 % APS</b>	100 µl	100 µl	100 µl
<b>TEMED</b>	5 µl	5 µl	10 µl

# 5 Methoden

## 5.1 Wachstumsbedingungen

### 5.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli* Zellen wurden in LB-Medium auf einem Rotationsschüttler über Nacht (üN) inkubiert. Zur Selektion auf Plasmide wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Festmedien enthielten 2 % (w/v) Agar.

Für die Dauerkultur wurden 800 µl Zellsuspension zu 50 prozentigem Glycerin gegeben und bei -80 °C eingefroren.

### 5.1.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* Zellen wurden in YP Medium kultiviert. Für Vorkulturen wurde YPD (YP mit 2 % (w/v) Glc) verwendet. Wenn auf komplementierte Auxotrophien selektioniert werden sollte, wurde SC-Medium ohne die entsprechenden Aminosäuren (L-Histidin, L-Leucin, L-Tryptophan und Uracil) verwendet. Für fluoreszenzmikroskopische Experimente wurde LFM-Medium verwendet. Festmedien wurde 2 % (w/v) Agar zugesetzt. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenzen wurden die entsprechenden Antibiotika, wie in Tabelle 2 angegeben verwendet. Um auf verlorene Uracil-Auxotrophiemarker oder Plasmide zu selektionieren, wurde 5-FOA-Festmedium verwendet. Festmedien wurden zwei bis drei Tage bei 30 °C in einem Brutschrank, Flüssigmedien wurden üN bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Für die Dauerkultur wurden Zellen zunächst auf YPD-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden die Zellen von der Platte gekratzt und in 1 ml 15 prozentiger Glycerinlösung bei -80 °C gelagert.

#### 5.1.2.1 Kultivierung der *nce103Δ*-Mutante

Da die *nce103Δ*-Mutante einen Wachstumsdefekt in normaler Luft aufweist (Gotz *et al.*, 1999), wurde sie in CO<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre kultiviert.



Für Kultivierung auf YPD-Platten wurde in den Deckel der Petrischale 2,5 g kristallines Natriumhydrogencarbonat gegeben und mit etwas dH<sub>2</sub>O befeuchtet. Die Platte wurde anschließend zweimal mit Klebeband luftdicht umschlossen und bei 30 °C inkubiert.

Um die Mutanten in Flüssigmedium zu kultivieren, wurden Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben luftdicht mit Klebeband verschlossen und bei 30 °C rollend oder schüttelnd inkubiert. Dies verhindert, dass das von den Hefezellen gebildete CO<sub>2</sub> in die Außenluft entweichen kann.

### 5.1.2.2 Sporulation von *S. cerevisiae*

Alle Experimente wurden in diploiden Hefestämmen mit dem genetischen SK1-Hintergrund durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, lagen alle in das Genom eingeführten Mutationen in homozygoter Form vor. Alle Hefestämmen, in denen Proteine spezifisch während der Meiose depletiert werden sollten enthielten *P<sub>IME2</sub>-pTEV+*, genomisch in den *URA3*-Locus integriert und zusätzlich, zur Erhöhung der Proteasemenge, das 2 $\mu$ -Plasmid pDS37, das *P<sub>IME2</sub>-GFP-pTEV+* enthält.

Für die Sporulation in Flüssigmedien wurden die Zellen auf YPD-Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf YP-Platten mit 3 % Glycerin ausgestrichen und erneut für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Eine Vorkultur wurde mit einer streichholz kopfgroßen Menge Zellen in 50 ml YP + 2 % Raff angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 20 h bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler. Am nächsten Tag wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und für eine Sporulationskultur eine 40 OD<sub>600</sub> entsprechende Zellmenge entnommen, einmal mit Wasser gewaschen und in SPO-Medium resuspendiert. Das SPO-Medium enthielt 1 %, 0,1 % oder 0,01 % KOAc.

Für die Sporulation auf Festmedien wurden 2 prozentige Agarplatten mit 1 %, 0,1 % und 0,01 % KOAc verwendet. Zunächst wurden die Zellen auf YPD-Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C in einem Brutschrank inkubiert. Dann wurde eine etwa daumennagelgroße Menge Zellen von der Platte gekratzt und in dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Auf jede SPO-Platte wurde 50  $\mu$ l dieser Zellsuspension getropft und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Für die Experimente mit CO<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre, wurde in den Deckel der Petrischale 2,5 g kristallines Natriumhydrogencarbonat gegeben und mit etwas dH<sub>2</sub>O befeuchtet. Die Platten wurden zweimal mit Klebeband luftdicht umschlossen und für zwei Tage bei 30 °C in einem Brutschrank inkubiert.

Um die Alkalisierung des Mediums zu überprüfen wurden SPO-Platten mit Phenolrotzusatz verwendet. Dazu wurde auf pH 7 mit Essigsäure gepuffertes KOAc verwendet. Die 2 prozentigen Agarplatten enthielten 1 % KOAc (pH 7) und 25 mg/l (w/v) Phenolrot. Um gleiche Mengen an Zellen auf die Platten zu tropfen, wurden die Zellen in H<sub>2</sub>O resuspendiert und die optische Dichte gemessen. Anschließend wurde von jedem Stamm eine gleiche Zellmenge auf die Phenolrot-SPO-Platten getropft.

### 5.1.3 Messung der optischen Dichte in Flüssigkulturen

Zum Messen der optischen Dichte (OD) als Maß der Zelldichte wurde das WPA Biowave CO8000 Cell Density Meter (BIOCHROM LTD., Cambridge, UK) verwendet. Es wurde jeweils die Differenz der optischen Dichte von Nährmedium und Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen ( $\Delta OD_{600}$ ). Ab einer  $\Delta OD_{600}$  von 1 wurde die Kultur mit Medium verdünnt und nochmals gemessen. Bei *E. coli* Kulturen entspricht eine  $\Delta OD_{600}$  von 1 einer Zelldichte von ca.  $2 \times 10^8$  Zellen/ml, bei *S. cerevisiae* einer von ca.  $1,5 \times 10^7$  Zellen/ml.

### 5.1.4 Färbung von *S. cerevisiae* Zellen mit Jod-Dämpfen

Um Hefezellen über Joddämpfen zu färben, wurde eine Vorkultur in 3 ml YPD angeimpft und üN bei 30 °C auf einem Rollinkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurde von jeder Kultur die OD<sub>600</sub> bestimmt, eine 0,1 OD<sub>600</sub> entsprechende Zellmenge entnommen und mit YPD auf 1 ml aufgefüllt. Von dieser Verdünnung wurden 2 µl auf eine YPD Platte getropft und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

Für die Jodfärbung wurde resublimiertes Jod ( $\geq 99,8$  %, p.a., ACS, resublimiert; CARL ROTH GMBH & CO KG (Karlsruhe, D)) in Kugelform in den Deckel der Petrischale gegeben und die Zellen so lange über die entstehenden Joddämpfe gehalten, bis eine deutliche Gelb-, beziehungsweise Braunfärbung zu erkennen war. Die Platte wurde vor und nach der Jodfärbung fotografiert.

### 5.1.5 Induktion der *cre*-Rekombinase

Die *cre*-Rekombinase diente bei der Herstellung des Stammes YMJ159 der Entfernung des *klURA3*-Auxotrophiemarkers im TDegF-Konstrukt. Dafür wurde das Plasmid

pSH65, das für die *cre*-Rekombinase kodiert und eine Phleomycinresistenzkassette beinhaltet (Guldener *et al.*, 1996) in den Stamm YDS57 transformiert. Die Zellen wurden nach der Transformation auf YP-Platten mit 2 % Galaktose, denen zusätzlich 7,5 µg/ml Phleomycin zugesetzt wurde, ausplattiert und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Um zu überprüfen, ob der *klURA3*-Auxotrophiemarker durch die *cre*-Rekombinase entfernt wurde, erfolgte eine Replikaplattierung der Kolonien auf 5-FOA-Platten. Zusätzlich wurde der Verlust von *klURA3* auch durch PCR überprüft. Auf 5-FOA-Platten wachsende Kolonien wurden anschließend mehrmals auf YPD-Platten umgestrichen, um einen Verlust des pSH65-Plasmides herbeizuführen. Der Verlust von pSH65 wurde durch Ausstreichen der Zellen auf Phleomycinhaltige Platten überprüft.

### 5.1.6 Bestimmung der Lokalisation von Msn2-GFP

Die Untersuchung der Msn2-GFP Lokalisation in Abhängigkeit verschiedener Kohlenstoffquellen und Bicarbonat erfolgte wie folgt beschrieben. Der Stamm YCT1193 wurde in 3 ml LFM-Medium mit 2 % Glc üN bei 30 °C angezogen. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur aus der Vorkultur angeimpft, die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Glasbodenschälchen (MATTEK CORPORATION, Ashwell USA) geklebt. Dazu wurde 200 µl einer 3 prozentigen Concanavalin-A Lösung (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D) in die Mitte der Schälchen auf den Glasboden pipettiert. Nach 5 min wurde die Lösung abgenommen und der Glasboden mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden 200 µl der Zellkultur auf den Glasboden pipettiert. Es wurde 5 min gewartet, bis sich die Zellen auf den Glasboden abgesenkt hatten. Das Medium wurde entfernt, es wurde einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. In die Schälchen wurde dann 2ml LFM-Medium mit 2 % Glc gegeben.

Es folgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop. Es wurde ein Axiovert 200M Mikroskop der Firma ZEISS benutzt. Das Mikroskop war mit einem Plan Apochromat Öl Objektiv (NA 1,4; ZEISS), einer Digitalkamera (HAMAMATSU) und einem GFP-Filter-Set (ZEISS) ausgerüstet. Die Bilder wurden mit der Software Volocity (Version 5.03, PERKIN ELMER, Waltham, Massachusetts, USA) aufgenommen.

Für jedes Experiment wurden zwischen 100 und 200 Zellen aufgenommen. Es wurden Durchlichtbilder (DIC) und GFP-Z-Stapel aufgenommen. Anschließend wurde das LFM-Medium aus den Schälchen entfernt. Es wurde einmal mit LFM-Medium ohne

Glukose gewaschen und dann 2 ml LFM-Medium ohne Glukose zu den Zellen gegeben. Fünf Minuten nach Entfernen von Glukose wurden erneut von etwa 100-200 Zellen Durchlichtbilder (DIC) und GFP-Z-Stapel aufgenommen. Im Anschluss daran wurde in je ein Schälchen entweder 2 % Glc, 1 % KOAc, 10 mM Natriumhydrogencarbonat oder 2 % Glycerin gegeben. Fünf und 30 min nach Zugabe der Substanzen wurden erneut von 100-200 Zellen Durchlichtbilder (DIC) und GFP-Z-Stapel aufgenommen.

Die Auswertung der Bilder erfolgte unter Verwendung der Software ImageJ (Version 1.44p). Dafür wurde eine Maximumprojektion der einzelnen GFP-Stapel angelegt und in mehr als 200 Zellen für jeden Zeitpunkt und jede Bedingung ermittelt, ob Msn2-GFP im Zellkern oder im Cytoplasma lokalisierte.

## **5.2 Hoechst-Färbung von *S. cerevisiae* Zellen**

Sporulierte Zellen wurden von den SPO-Platten gekratzt und in 70 prozentigen Ethanol aufgenommen. Die Zellen wurden für 1 h bei Raumtemperatur (RT) in Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei 400 g für 3 min abzentrifugiert. Das überstehende Ethanol wurde abgenommen und die Zellen wurden in 50 prozentiger Glycerinlösung mit 1 µg/ml Hoechst 33342, zur Färbung der DNA, aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurden die Zellen entweder bei -20 °C gelagert oder direkt einer mikroskopischen Analyse unterzogen.

## **5.3 Auswertung der Sporulation und Bestimmung der Sporulationseffizienz**

Für die Auswertung der Sporulation und Bestimmung der Sporulationseffizienz wurden mit Hoechst 33342 gefärbte Zellen verwendet. Für jedes Experiment wurden mehr als 200 Zellen aufgenommen. Es wurden Durchlichtbilder (DIC) und DAPI-Z-Stapel aufgenommen. Jedes Experiment wurde mindestens zweimal mit mindestens zwei voneinander unabhängigen Transformanden wiederholt. Es wurde ein 63 x Axiovert 200M Mikroskop der Firma ZEISS benutzt. Das Mikroskop war mit einem Plan Achromat Öl Objektiv (NA 1,4; ZEISS), einer Digitalkamera (HAMAMATSU) und einem DAPI-Filter-Set (ZEISS) ausgerüstet. Die Bilder wurden mit der Software Volocity (Version 5.0.3) aufgenommen. Zur Auswertung der Bilder wurde mit der Software ImageJ (Version 1.44p) eine Maximumprojektion der DAPI-Z-Stapel angelegt, die mit

dem entsprechenden DIC-Bild überlagert wurde. Die verschiedenen zur Auswertung herangezogenen Zellspezies sind in Abbildung 10 aufgeführt. Die Sporulationseffizienz wurde nach folgender Formel berechnet:  $[(\% \text{ Tetraden} * 4) + (\% \text{ Triaden} * 3) + (\% \text{ Dyaden} * 2) + \% \text{ Monaden}] / 4$ .

#### **5.4 Tetradendisektion**

Die Tetradendisektion wurde verwendet um aus diploiden Stämmen haploide Sporen zu isolieren, die zur Stammherstellung mit anderen haploiden Sporen gekreuzt werden konnten. Desweiteren konnte durch Tetradendisektion die Verteilung der molekularen Marker überprüft werden.

Für die Tetradendisektion wurden die entsprechenden diploiden Zellen zunächst auf SPO-Platten mit 1 % KOAc für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Sporulierten Zellen wurden in einer Mischung aus 10 µl dH<sub>2</sub>O und 10 µl Lyticase-Lösung mit 500 Units/ml (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim, D) für 10 min bei 30 °C inkubiert. Die Zymolyase-Behandlung führt zur Verdauung der Zellwand, die Sporen werden aufgrund ihrer Zellwandbeschaffenheit nicht beeinflusst. Anschließend wurde 10 µl der angedauten Zellen so auf eine YPD-Platte getropft, dass sich die Zellen in einem waagrechten, schmalen Streifen verteilen. Für die Tetradendisektion wurde das Mikroskop ECLIPSE 50i (NIKON), mit einem montierten Mikromanipulator benutzt. Der Mikromanipulator trägt eine Glasfasernadel (SCHUETTLABORTECHNIK, Göttingen, D), mit deren Hilfe die vier Sporen einer Tetrade auf der YPD-Platte untereinander ausgelegt wurden. Dies wurde mit etwa 10 Tetraden durchgeführt. Anschließend wurden die YPD-Platten bei 30 °C inkubiert, bis aus den einzelnen Sporen gut erkennbare Kolonien entstanden sind. Zur Überprüfung auf molekulare Marker wurden die Kolonien auf entsprechende Selektionsplatten replika-plattiert.

#### **5.5 Bestimmung des Paarungstyps**

Um den Paarungstyp von haploiden Zellen zu bestimmen wurden zwei Methoden verwendet:

### 5.5.1 Überprüfung des Paarungstyps durch Kreuzung mit Tester-Stämmen

Um den Paarungstyp eines haploiden Stammes durch Kreuzung zu bestimmen, wurden die Stämme YR312 (*MATa*) und YR320 (*MAT $\alpha$* ) verwendet. Beide Stämme sind durch eine Mutation im *HIS1*-Gen (*his1*) Histidin-auxotroph. Sie können also auf SC Platten, denen Histidin und Uracil fehlt nicht wachsen. Um den Paarungstyp eines bestimmten Stammes zu bestimmen, wurde er sowohl mit YR312, als auch YR320 auf SC –URA –HIS-Platten gekreuzt. Alle getesteten Stämme besaßen eine Uracil-Auxotrophie, konnten also auf SC –URA –HIS Platten nur dann wachsen, wenn sie sich entweder mit YR312 oder YR320 paaren konnte, da sich dann die jeweiligen Auxotrophien komplementierten. Auf diese Weise konnte eindeutig bestimmt werden, welchen Kreuzungstyp der zu testende Stamm hat.

### 5.5.2 Überprüfung des Paarungstyps durch PCR

In den seltenen Fällen, in denen eine Bestimmung des Paarungstyps aufgrund fehlender Auxotrophien nicht möglich war, wurde er mittels PCR bestimmt.

Dafür wurde folgender PCR Ansatz verwendet:

5  $\mu$ l Taq Puffer  
2  $\mu$ l Primer Mix (*MATalpha1*, *MATa1*, Matrev; Verhältnis 1:1:1)  
1  $\mu$ l dNTPs  
1  $\mu$ l genomische DNA  
1  $\mu$ l Taq  
40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

95 °C  
54 °C 45 s  
72 °C 1 min  
95 °C 30 s  
30 Wiederholungen  
8 °C Lagerung

In einem Stamm mit dem Paarungstyp *MATa* entsteht durch Amplifikation mit den Primern *MATa1* und Matrev ein 900 bp großes Produkt. Im Falle eines Stammes mit dem Paarungstyp *MAT $\alpha$*  entsteht durch Amplifikation mit den Primer *MATalpha1* und Matrev ein 1000 bp großes Produkt.

## 5.6 Bestimmung der Zell- und Ascusgröße durch Impedanzmessung

Zur Bestimmung der Zell- und Ascusgröße wurde der Multisizer™ 3 COULTER COUNTER® der Firma BECKMAN COULTER INC. verwendet. Für die Messungen wurde eine 100 µm Kapillare (für Messung von Partikeln im Größenbereich von 2 µm bis 60 µm; BECKMAN COULTER INC.) verwendet. Gesteuert wurde die Messung durch die Multisizer™ 3 Software (Version 5.53). Es wurden Standardeinstellungen benutzt.

Zur Bestimmung der Zellgröße während des vegetativen Wachstums wurden die entsprechenden Stämme in 3 ml YPD ün bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Hauptkultur aus der Vorkultur angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase weiter bei 30 °C inkubiert. In eine spezielle Plastikkuvette wurden 20 ml Beckman Isotone II Lösung und 100 µl der Zellkultur gegeben und geschüttelt. Die Messung der Zellgröße erfolgte direkt im Anschluss, es wurden in jedem Fall mehr als 50 000 Zellen gemessen. Für die Auswertung wurde der Partikeldurchmesser gemittelt, es wurden nur Partikel ausgewertet, die sich in einen Größenbereich von 2-30 µm befanden. Hefezellen sind durchschnittlich 5-8 µm groß, da sie aber dazu neigen zusammen zu klumpen, wurden bei der Messung auch größere Partikel gemessen. Die Zahl einzelner Zellen überwiegt aber die Anzahl großer Zellklumpen deutlich.

Zur Messung der Ascusgröße wurden die Zellen auf YPD Platten ausgestrichen und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen von der Platte gekratzt, und in dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Auf eine SPO-Platte mit 1 % KOAc wurde von jedem Stamm 50 µl der Zellsuspension getropft und erneut für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Eine etwa streichholzkopfgroße Menge der, von der SPO-Platte gekratzten Zellen wurde in 100 µl Wasser resuspendiert. 50µl dieser Zellsuspension wurde in eine Plastikkuvette mit 20 ml Beckman Isotone II Lösung gegeben und geschüttelt. Die Messung erfolgte wie oben für die Messung der Zellgröße während des vegetativen Wachstums angegeben. Die Parameter für die Auswertung waren die gleichen wie oben angegeben.

## 5.7 Transformation von DNA

### 5.7.1 Transformation chemokompetenter *E. coli* Zellen

Chemokompetente *E. Coli* Zellen wurden wie in Hanahan, 1983 beschrieben hergestellt. Die Transformation erfolgte wie in Pope and Kent, 1996 beschrieben.

### 5.7.2 Transformation elektrokompeter *E. coli* Zellen

Ein Aliquot elektrokompeter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und in eine gekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite überführt. Es wurde 1 µl Plasmid DNA zu den Zellen gegeben. Luftblasen wurden durch Klopfen der Küvette entfernt. Die Elektroporation erfolgte mit den folgenden Einstellungen: Spannung: 2,15 kV, Widerstand 200 Ω, Kapazität 25 µF. Die Zeitkonstante lag zwischen 4,6 und 4,8 ms. Die Zellen wurden nach der Elektroporation in 1 ml gekühltes LB Medium überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 2300g für 3 min pelletiert, auf LB<sub>AMP</sub>-Platten ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert.

### 5.7.3 Transformation von *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* Zellen wurden in abgewandelter Form mittels der in Knop *et al.*, 1999 beschriebenen Lithiumacetat (LiOAc) Methode transformiert. Es wurden 50 ml YPD aus einer üN-Kultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden bei 400 g für 3 min pelletiert und einmal mit 50 ml Wasser gewaschen. Nach einem weiteren Pelletierungsschritt wurden die Zellen in 20 ml LiSORB resuspendiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 450 µl LiSORB resuspendiert, zusätzlich wurde 50 µl vorher aufgekochte und abgekühlte Heringssperma-DNA zu den Zellen gegeben. Je 50 µl Aliquots wurden entweder bei -80 °C gelagert oder direkt zur Transformation verwendet.

Zur Transformation wurde etwa 5-10 µl Plasmid DNA zu 50 µl, auf Eis aufgetauten, kompetenten Zellen gegeben und gemischt. Es folgte eine 20 minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 42 °C in einem Heizblock inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml YPD zu den Zellen gegeben und für 3 min bei 400 g zentrifugiert. Bei Selektion auf Antibiotikaresistenz selektioniert, wurde der Überstand



abgenommen und erneut 1 ml YPD zugegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 400 g für 3 min, der Überstand abgenommen und die Zellen, vor dem Ausplattieren auf Antibiotika haltige YPD-Platten, in 3 ml YPD für 4-6 h bei 30 °C inkubiert. Wurde auf Auxotrophie-Komplementation selektioniert, wurden die Zellen direkt nach dem ersten Waschschrift auf entsprechende SC-Platten ausplattiert.

## 5.8 Isolierung und Manipulation von DNA

### 5.8.1 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*

Präparation von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte durch Alkalische Lyse. 1,5 ml einer üN Kultur wurden für 2 min bei 2300 g pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Dann wurde 200 µl Lösung 2 zugegeben und gemischt. Die Lyse erfolgte für 5 min bei RT. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 3 wurden die lysierten Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 17000 g. 400 µl des Überstandes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 ml eiskaltes, 100 prozentiges Ethanol zugegeben und für 10 min bei -20 °C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend für 10 min bei 17000 g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die gefällte DNA in 20 µl ddH<sub>2</sub>O mit 1 µl RNase gelöst.

Alternativ wurde das Plasmid Mini Kit der Firma QUIAGEN GmbH (Hilden, D) verwendet. Die Verwendung erfolgte nach Empfehlungen des Herstellers.

### 5.8.2 DNA-Isolierung aus *S. cerevisiae*

Eine ungefähr streichholzkopfgroße Menge Zellen wurde von YPD-Platten gekratzt und in 500 µl Extraktionspuffer mit 200 µl Glasperlen (0,25-0,5 mm Durchmesser) gegeben. Anschließend wurde 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und auf einem Vibrax Basic-Schüttler (IKA) 10 min lang bei 4 °C geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 17000 g. 400 µl der wässrigen Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 ml eiskaltes, 100 prozentiges Ethanol zugegeben. Die Ansätze wurden für 10 min bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 17000 g für 10 min wurde das Pellet leicht getrocknet und in 20 µl ddH<sub>2</sub>O mit 1 µl RNase A resuspendiert.

### 5.8.3 DNA-Amplifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion

Für die Herstellung von PCR-Produkten für Genfusionen wurden die Primer wie in Janke *et al.*, 2004 beschrieben entworfen. Es wurden die PCR-Blöcke Primus 25 advanced oder Primus 96 advanced (PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GMBH, Erlangen, D) verwendet:

Für die Amplifizierung der PCR-Produkte wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

10 µl	10x Pfu Puffer
3,5 µl	10 mM dNTPs
6,5 µl	10 µM Primer
6,5 µl	10 µM Primer
2 µl	Plasmid DNA
69,5 µl	H <sub>2</sub> O
2 µl	Taq/Pfu (2:1) Polymerase-Mischung; Zugabe nach Denaturierung

Folgendes PCR-Programm verwendet:

98 °C            30s  
 Deckel öffnen  
 Zugabe der Polymerase  
 Deckel schließen

10 Zyklen:  
 58 °C            45s  
 68 °C            Elongation (1 min/kb)  
 98 °C            30s

20 Zyklen  
 56 °C            45s  
 72 °C            Elongation (1 min/kb + 10 s/Zyklus)  
 98 °C            30s  
 8 °C             Lagerung

Für Test-PCRs wurde folgender Ansatz verwendet:

5 µl	10 x Taq Puffer
1 µl	10 mM dNTPs
2 µl	10 µM Primer 1
2 µl	10 µM Primer 2
1 µl	genomische DNA
38 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	Taq

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

35 Zyklen	
98 °C	30 s
58 °C	45 s
72 °C	1 min/1000 bp
98 °C	30s
8 °C	Lagerung

Für die *Quickchange* Mutagenese wurde folgender PCR-Ansatz verwendet, die KOD-Polymerase stammte von NOVAGEN (Darmstadt, D):

5 µl	KOD Puffer 1 (NOVAGEN)
3,2 µl	10 µM Primer 1
3,2 µl	10 µM Primer 2
8,8 µl	2 mM dNTPs
1,5 µl	Plasmid DNA
5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
22,8 µl	H <sub>2</sub> O

1 µl KOD-Polymerase; Zugabe nach erstem Denaturierungsschritt

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

19 Zyklen	
95 °C	30 s
55 °C	45s
68 °C	1s/80 bp
8 °C	Lagerung

Um die DNA aus dem PCR-Ansatz zu konzentrieren wurden zum PCR-Ansatz 1/10 Volumen 3 M Ammoniumacetat pH 5,2 und 2,5 x Volumen 100 % eiskaltes Ethanol gegeben. Nach Durchmischen wurde der Ansatz für 30 min bei -20 °C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 17000 g für 10 min. Der Überstand wurde abgenommen, die präzipitierte DNA in 10 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, um das unmutierte, aus *E. coli* stammende Plasmid zu zerstören. Nach Deaktivierung von *DpnI* für 20 min bei 80 °C wurde der gesamte Restriktionsansatz in chemokompetente *E. coli* Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB<sub>AMP</sub>-Platten.

#### **5.8.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA Fragmenten**

DNA Fragmente wurden in 1 prozentigen TAE-Agarosegelen bei einer Spannung von 80-120 V aufgetrennt. Als Größenstandard diente der „GeneRuler™ DNA Ladder Mix“ (FERMENTAS GmbH, St. Leon-Rot, D). Die Agarosegele wurden zur Detektion der Banden für 10 min in 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung inkubiert und anschließend für 10 min in einem Wasserbad entfärbt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einem GelDoc XR System und der Software Quantity One 1-D (BIO-RAD LABORATORIES GmbH).

#### **5.8.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

DNA wurde nach Vorschrift des E.Z.N.A. Gel-Extraction-Kit (OMEGA BIO-TEK, Norcross, USA) oder des „QIAquick® Gel Extraction Kit“ (QIAGEN GmbH) aus 1 prozentigen TAE-Agarosegelen extrahiert.

#### **5.8.6 Enzymatische Restriktion von DNA**

Verwendete Restriktionsenzyme wurden von den Firmen FERMENTAS (St. Leon-Rot, D) und NEW ENGLAND BIOLABS INC. (Ipswich, UK) bezogen. Die Restriktion erfolgte unter von den Herstellern empfohlenen Bedingungen.

#### **5.8.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Für die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde die DNA im Anschluss an den Restriktionsverdau mit „Alkalische Phosphatase - Shrimp“ (ROCHE GmbH) in dem vorgesehenen Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzen auf 65 °C für 15 min.

#### **5.8.8 Ligation von DNA**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (FERMENTAS, St. Leon-Rot, D). Die freien Enden des Plasmid-Rückgrats wurde wie in Abschnitt 5.8.7 beschrieben dephosphoryliert. Plasmid-Rückgrat und Insert wurden etwa im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei RT für 1 h in T4 DNA-

Ligase-Puffer. Es wurden 5 µl des Ligationsansatzes in chemokompetente *E. Coli* Zellen transformiert.

### **5.8.9 *In vivo* Ligation in *S. cerevisiae***

Die *in vivo* Ligation von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* erfolgte nach der in Jansen *et al.*, 2005 beschriebenen Methode. Für *in vivo* Ligationen wurde der Hefestamm ESM356 verwendet.

### **5.8.10 Chromosomale Integration von DNA in *S. cerevisiae***

Chromosomale Integration von DNA in *S. cerevisiae* erfolgte nach der in Janke *et al.*, 2004 beschriebenen Methode. Die gewählten PCR-Bedingungen finden sich in Abschnitt 5.8.3. Einzelheiten zu verwendeten Primern finden sich in den Tabelle5 und Tabelle7.

### **5.8.11 Sequenzierung von DNA**

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurden 4,3 µl DNA (0,6-0,7 µg) mit 0,7 µl 100 mM Tris/HCl (pH 8,8) und 2 µl Oligonukleotid-Lösung (10 µM) gemischt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1992) als Extended Hotshot durch SEQUENCE LABORATORIES GÖTTINGEN GMBH (Göttingen, D).

## **5.9 Proteinanalyse und –detektion**

### **5.9.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae***

Die Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae* erfolgte durch TCA-Präzipitation. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde den Kulturen eine Zellmenge entnommen, die einer OD<sub>600</sub> von 1 entspricht. Die Zellsuspension wurde in auf Eis gekühlte Reaktionsgefäße pipettiert, die 150 µl Alkalischen Lysepuffer enthielten. Nach einer 10 minütigen Inkubation der Proben auf Eis wurde 150 µl 55 prozentige (w/v) Trichloressigsäure (TCA) zugegeben und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte

ein Zentrifugationsschritt bei 17000 g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 60-100 µl 8 M Harnstoffpuffer (HU)-Puffer resuspendiert. Die Proteinextrakte wurden entweder direkt für die Denaturierende Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, oder bei – 20 °C gelagert.

Um die Proteinmenge der während der Meiose gebildeten MP-Proteine zu bestimmen, wurden die Proteinextrakte in 60 µl HU-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde je Stamm von jedem Zeitpunkt 10 µl des Proteinextraktes in ein neues Reaktionsgefäß vereinigt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die vereinigten Proben spiegeln die gesamte, während der Meiose gebildete Menge an meiotischen Platte Proteinen wieder.

### **5.9.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Protein wurden nach ihrer relativen Molekularmasse unter denaturierenden und diskontinuierlichen Bedingungen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden selbst hergestellte SDS-Gele verwendet (Tabelle 10). Die Elektrophorese erfolgte in einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Mini Protean 3 Apparatur (BIORAD). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 150 V gestartet. Wenn die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde eine Spannung von 200 V eingestellt (Stromstärke 30 mA; Leistung 6 W). Als Größenstandard wurde Pageruler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS, St. Leon-Rot, D) verwendet.

### **5.9.3 Immunodetektion von Protein**

Zur Immunodetektion von Proteinen wurden sie vom Trenngel auf eine Protran® Nitrocellulosemembran (WHATMAN GmbH) transferiert. Es wurde eine mit Transferpuffer gefüllte (BIO-RAD LABORATORIES GmbH) verwendet. Folgender Aufbau wurde verwendet: Auf die schwarze Seite der Transferkassette wurden von unten nach oben aufgelegt: Faserkissen, WHATMAN® Filterpapier (WHATMAN GMBH), Trenngel, Protran® Nitrocellulosemembran, WHATMAN® Filterpapier, Faserkissen. Die Kassette wurde anschließend in die Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell eingelegt. Das Blotten erfolgte in einer bei einer Spannung von 20 V üN. Nach dem Blotten wurden die Proteine zur Überprüfung der Blotting-Effizienz mit Ponceau S-Lösung angefärbt, die anschließend durch Waschen mit dH<sub>2</sub>O wieder entfernt wurde.

Für die Bindung der Antikörper an die Membran wurde diese zunächst in TBST mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde anschließend zweimal mit TBST gewaschen. Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle8) in 5 % TBST mit 5 % Magermilchpulver gegeben. Die Inkubation der Membran erfolgte in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 1 h bei RT auf einem Rollinkubator (SRT6-Roller (Bibby Scientific Limited)). Anschließend wurde die Membran dreimal für 3 min mit TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle9) in TBST mit 5 % (w/v) Magermilchpulver gegeben. Die Inkubation erfolgte in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 1 h bei RT auf einem Rollinkubator. Nach der Inkubation wurde die Membran 6-mal für 3 min mit TBST gewaschen.

Die Detektion der Proteine erfolgte nach der ECL-Methode (Tesfaigzi *et al.*, 1994). Die ECL-Lösung wurde selbst hergestellt (siehe Tabelle1). Die überschüssige Flüssigkeit wurde durch Abtropfen lassen von den Membranen entfernt, dann wurde etwa 5 ml ECL-Lösung auf die Membran gegeben und für 1 min bei RT inkubiert. Die Chemolumineszenz wurde mit einer Chemostar Professional Apparatur (INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GMBH, Göttingen, D) detektiert, die Detektionszeit betrug abhängig von der Signalstärke etwa 1-10 min.

Um die Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde die Membran für 30 min bei 60 °C in einer Lösung aus 2 % SDS, 100 mM Tris/HCL (pH 6,8) und 0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert. Nach 3 drei minütigen Waschschritten wurde die Membran für 1 h bei RT in TBST mit 5 % (w/v) blockiert. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

#### **5.9.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Es wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M (CARL-ZEISS AG, Oberkochen, D) verwendet. Dieses war mit einer CCD-Kamera 1394 ORCA-ERA (HAMAMATSU, Herrsching am Ammersee, D) ausgerüstet. Es wurde ausschließlich ein 63 x Plan Aplanochromat Öl Objektiv (NA 1,4; ZEISS) benutzt. Als Immersionsöl wurde Immersol<sup>TM</sup> 518 F von ZEISS verwendet. Die Konfiguration von Mikroskop und Kamera erfolgte durch das Programm Volocity (PERKINELMER LIFE und ANALYTICAL SCIENCES, INC., Rodgau-Jügesheim, D). GFP-Fluoreszenz wurde mit einem enhanced GFP-Filterwürfel (Anregung 488 nm, Emission 509 nm), Fluoreszenz von Hoechst 33342 mit einem

DAPI-Filterwürfel (Anregung 350 nm, Emission 461 nm) verwendet. Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Software ImageJ, Version 1.44p (Collins, 2007)

## 5.10 Software

Mikroskopsteuerung: Volocity Version 5.0.3 (PERKIN ELMER, Waltham, Massachusetts, USA)

Planung von DNA Manipulationen *in silico*: Clone Manager 9 Basic Edition (SCIENTIFIC & EDUCATIONAL SOFTWARE; Cary USA).

Überprüfung von Sequenzierungen: Sequencher® Software (Demo Version; GENE CODES CORPORATION, Ann Arbor, MI USA).

Auswertung von Mikroskopiedaten: ImageJ (Version 1.44p; open source; Collins, 2007)

Alignment von Proteinsequenzen: Clustal X (Version 2.1; Jeanmougin *et al.*, 1998)



## 6 Literaturverzeichnis

- Achstetter, T., and Wolf, D.H. (1985). Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *1*, 139-157.
- Alepuz, P.M., Matheos, D., Cunningham, K.W., and Estruch, F. (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* RanGTP-binding protein *msn5p* is involved in different signal transduction pathways. *Genetics* *153*, 1219-1231.
- Alspaugh, J.A., Pukkila-Worley, R., Harashima, T., Cavallo, L.M., Funnell, D., Cox, G.M., Perfect, J.R., Kronstad, J.W., and Heitman, J. (2002). Adenylyl cyclase functions downstream of the Galpha protein *Gpa1* and controls mating and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* *1*, 75-84.
- Anderson, S.F., Steber, C.M., Esposito, R.E., and Coleman, J.E. (1995). UME6, a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*, contains a C-terminal Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binuclear cluster that binds the URS1 DNA sequence in a zinc-dependent manner. *Protein Sci* *4*, 1832-1843.
- Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* *234*, 179-186.
- Bachmair, A., and Varshavsky, A. (1989). The degradation signal in a short-lived protein. *Cell* *56*, 1019-1032.
- Bahn, Y.S., Cox, G.M., Perfect, J.R., and Heitman, J. (2005). Carbonic anhydrase and CO<sub>2</sub> sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Curr Biol* *15*, 2013-2020.
- Bajgier, B.K., Malzone, M., Nickas, M., and Neiman, A.M. (2001). SPO21 is required for meiosis-specific modification of the spindle pole body in yeast. *Mol Biol Cell* *12*, 1611-1621.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., and Hall, M.N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* *7*, 25-42.
- Baroni, M.D., Martegani, E., Monti, P., and Alberghina, L. (1989). Cell size modulation by CDC25 and RAS2 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *9*, 2715-2723.
- Battle, M., Lu, A., Green, D.A., Xue, Y., and Hirsch, J.P. (2003). *Krh1p* and *Krh2p* act downstream of the *Gpa2p* G(alpha) subunit to negatively regulate haploid invasive growth. *J Cell Sci* *116*, 701-710.
- Beck, T., and Hall, M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* *402*, 689-692.
- Belotti, F., Tisi, R., and Martegani, E. (2006). The N-terminal region of the *Saccharomyces cerevisiae* RasGEF *Cdc25* is required for nutrient-dependent cell-size regulation. *Microbiology* *152*, 1231-1242.
- Benjamin, K.R., Zhang, C., Shokat, K.M., and Herskowitz, I. (2003). Control of landmark events in meiosis by the CDK *Cdc28* and the meiosis-specific kinase *Ime2*. *Genes Dev* *17*, 1524-1539.
- Bernstein, K.A., Bleichert, F., Bean, J.M., Cross, F.R., and Baserga, S.J. (2007). Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. *Mol Biol Cell* *18*, 953-964.
- Beullens, M., Mbonyi, K., Geerts, L., Gladines, D., Detremerie, K., Jans, A.W., and Thevelein, J.M. (1988). Studies on the mechanism of the glucose-induced cAMP signal in glycolysis and glucose repression mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* *172*, 227-231.

- Bianconi, M.L. (2003). Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. *J Biol Chem* 278, 18709-18713.
- Bisson, L.F., Coons, D.M., Kruckeberg, A.L., and Lewis, D.A. (1993). Yeast sugar transporters. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28, 259-308.
- Boles, E., and Hollenberg, C.P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 21, 85-111.
- Bolte, M., Steigemann, P., Braus, G.H., and Irniger, S. (2002). Inhibition of APC-mediated proteolysis by the meiosis-specific protein kinase Ime2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4385-4390.
- Boutros, M., and Ahringer, J. (2008). The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet* 9, 554-566.
- Boy-Marcotte, E., Tadi, D., Perrot, M., Boucherie, H., and Jacquet, M. (1996). High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 142 ( Pt 3), 459-467.
- Bremer, J. (1983). Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev* 63, 1420-1480.
- Briza, P., Ellinger, A., Winkler, G., and Breitenbach, M. (1988). Chemical composition of the yeast ascospore wall. The second outer layer consists of chitosan. *J Biol Chem* 263, 11569-11574.
- Briza, P., Winkler, G., Kalchhauser, H., and Breitenbach, M. (1986). Dityrosine is a prominent component of the yeast ascospore wall. A proof of its structure. *J Biol Chem* 261, 4288-4294.
- Broach, J.R. (1991). RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. *Trends Genet* 7, 28-33.
- Broek, D., Samiy, N., Fasano, O., Fujiyama, A., Tamanoi, F., Northup, J., and Wigler, M. (1985). Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell* 41, 763-769.
- Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S., and Wigler, M. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48, 789-799.
- Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J., and Levin, L.R. (1999). Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 79-84.
- Byers, B., and Goetsch, L. (1975). Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 124, 511-523.
- Cann, M.J., Hammer, A., Zhou, J., and Kanacher, T. (2003). A defined subset of adenylyl cyclases is regulated by bicarbonate ion. *J Biol Chem* 278, 35033-35038.
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2, 202-207.
- Carlucci, A., Lignitto, L., and Feliciello, A. (2008). Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol* 18, 604-613.
- Casal, M., Cardoso, H., and Leao, C. (1996). Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 142 ( Pt 6), 1385-1390.
- Casperson, G.F., Walker, N., Brasier, A.R., and Bourne, H.R. (1983). A guanine nucleotide-sensitive adenylate cyclase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 258, 7911-7914.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., and Young, R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* 12, 323-337.

- Celenza, J.L., and Carlson, M. (1984). Structure and expression of the SNF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4, 54-60.
- Celenza, J.L., Eng, F.J., and Carlson, M. (1989). Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 9, 5045-5054.
- Chen, J.C., and Powers, T. (2006). Coordinate regulation of multiple and distinct biosynthetic pathways by TOR and PKA kinases in *S. cerevisiae*. *Curr Genet* 49, 281-293.
- Chen, R.E., and Thorner, J. (2010). Systematic epistasis analysis of the contributions of protein kinase A- and mitogen-activated protein kinase-dependent signaling to nutrient limitation-evoked responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 185, 855-870.
- Chen, Y., Cann, M.J., Litvin, T.N., Iourgenko, V., Sinclair, M.L., Levin, L.R., and Buck, J. (2000). Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625-628.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O., and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282, 699-705.
- Chu, S., and Herskowitz, I. (1998). Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Mol Cell* 1, 685-696.
- Ciechanover, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1984). The ubiquitin-mediated proteolytic pathway and mechanisms of energy-dependent intracellular protein degradation. *J Cell Biochem* 24, 27-53.
- Clancy, M.J., Shambaugh, M.E., Timpte, C.S., and Bokar, J.A. (2002). Induction of sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* leads to the formation of N6-methyladenosine in mRNA: a potential mechanism for the activity of the IME4 gene. *Nucleic Acids Res* 30, 4509-4518.
- Clifton, D., Walsh, R.B., and Fraenkel, D.G. (1993). Functional studies of yeast glucokinase. *J Bacteriol* 175, 3289-3294.
- Collins, T.J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques* 43, 25-30.
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, M.F., Colavizza, D., *et al.* (1998). Involvement of distinct G-proteins, Gpa2 and Ras, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17, 3326-3341.
- Colombo, S., Ronchetti, D., Thevelein, J.M., Winderickx, J., and Martegani, E. (2004). Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 46715-46722.
- Colomina, N., Gari, E., Gallego, C., Herrero, E., and Aldea, M. (1999). G1 cyclins block the Ime1 pathway to make mitosis and meiosis incompatible in budding yeast. *EMBO J* 18, 320-329.
- Coluccio, A.E., Rodriguez, R.K., Kernan, M.J., and Neiman, A.M. (2008). The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. *PLoS One* 3, e2873.
- Cooper, K.F., and Strich, R. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p is required for efficient induction and execution of meiotic development. *Eukaryot Cell* 1, 66-74.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L., Toufighi, K., Mostafavi, S., *et al.* (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* 327, 425-431.
- Covitz, P.A., Herskowitz, I., and Mitchell, A.P. (1991). The yeast RME1 gene encodes a putative zinc finger protein that is directly repressed by a1-alpha 2. *Genes Dev* 5, 1982-1989.
- Crauwels, M., Donaton, M.C., Pernambuco, M.B., Winderickx, J., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M. (1997). The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is

- required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology 143 ( Pt 8)*, 2627-2637.
- Crechet, J.B., Pouillet, P., Mistou, M.Y., Parmeggiani, A., Camonis, J., Boy-Marcotte, E., Damak, F., and Jacquet, M. (1990). Enhancement of the GDP-GTP exchange of RAS proteins by the carboxyl-terminal domain of SCD25. *Science 248*, 866-868.
- Cross, F.R., and Blake, C.M. (1993). The yeast Cln3 protein is an unstable activator of Cdc28. *Mol Cell Biol 13*, 3266-3271.
- Davidow, L.S., Goetsch, L., and Byers, B. (1980). Preferential Occurrence of Nonsister Spores in Two-Spored Asci of *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*: Evidence for Regulation of Spore-Wall Formation by the Spindle Pole Body. *Genetics 94*, 581-595.
- De Silva-Udawatta, M.N., and Cannon, J.F. (2001). Roles of trehalose phosphate synthase in yeast glycogen metabolism and sporulation. *Mol Microbiol 40*, 1345-1356.
- De Virgilio, C., and Loewith, R. (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene 25*, 6392-6415.
- Dechant, R., Binda, M., Lee, S.S., Pelet, S., Winderickx, J., and Peter, M. (2010). Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J 29*, 2515-2526.
- Deng, C., and Saunders, W.S. (2001). ADY1, a novel gene required for prospore membrane formation at selected spindle poles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell 12*, 2646-2659.
- Dickinson, J.R., Dawes, I.W., Boyd, A.S., and Baxter, R.L. (1983). <sup>13</sup>C NMR studies of acetate metabolism during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A 80*, 5847-5851.
- Dohmen, R.J., and Varshavsky, A. (2005). Heat-inducible degron and the making of conditional mutants. *Methods Enzymol 399*, 799-822.
- Dohmen, R.J., Wu, P., and Varshavsky, A. (1994). Heat-inducible degron: a method for constructing temperature-sensitive mutants. *Science 263*, 1273-1276.
- Donaton, M.C., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Van Zeebroeck, G., Crauwels, M., Winderickx, J., and Thevelein, J.M. (2003). The Gap1 general amino acid permease acts as an amino acid sensor for activation of protein kinase A targets in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol 50*, 911-929.
- Dong, J., and Bai, X. (2011). The membrane localization of Ras2p and the association between Cdc25p and Ras2-GTP are regulated by protein kinase A (PKA) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett 585*, 1127-1134.
- Donzeau, M., and Bandlow, W. (1999). The yeast trimeric guanine nucleotide-binding protein alpha subunit, Gpa2p, controls the meiosis-specific kinase Ime2p activity in response to nutrients. *Mol Cell Biol 19*, 6110-6119.
- Eposito, M.S., Eposito, R.E., Arnaud, M., and Halvorson, H.O. (1969). Acetate utilization and macromolecular synthesis during sporulation of yeast. *J Bacteriol 100*, 180-186.
- Eposito, R.E., and Klapholz, S. (1981). Meiosis and Ascospore Development.
- Fazio, T.G., Kooperberg, C., Goldmark, J.P., Neal, C., Basom, R., Delrow, J., and Tsukiyama, T. (2001). Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression. *Mol Cell Biol 21*, 6450-6460.
- Feliciello, A., Gottesman, M.E., and Avvedimento, E.V. (2005). cAMP-PKA signaling to the mitochondria: protein scaffolds, mRNA and phosphatases. *Cell Signal 17*, 279-287.

- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I.A., Lerner, R.A., and Wigler, M. (1988). Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* 8, 2159-2165.
- Fingerman, I., Nagaraj, V., Norris, D., and Vershon, A.K. (2003). Sfp1 plays a key role in yeast ribosome biogenesis. *Eukaryot Cell* 2, 1061-1068.
- Fowell, R.R. (1969). Factors controlling sporulation of *Schizosaccharomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 35, Suppl:H21-22.
- Freese, E.B., Chu, M.I., and Freese, E. (1982). Initiation of yeast sporulation of partial carbon, nitrogen, or phosphate deprivation. *J Bacteriol* 149, 840-851.
- Freese, E.B., Olempska-Beer, Z., Hartig, A., and Freese, E. (1984). Initiation of meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae* by sulfur or guanine deprivation. *Dev Biol* 102, 438-451.
- Friedlander, G., Joseph-Strauss, D., Carmi, M., Zenvirth, D., Simchen, G., and Barkai, N. (2006). Modulation of the transcription regulatory program in yeast cells committed to sporulation. *Genome Biol* 7, R20.
- Friesen, H., Hepworth, S.R., and Segall, J. (1997). An Ssn6-Tup1-dependent negative regulatory element controls sporulation-specific expression of DIT1 and DIT2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17, 123-134.
- Friesen, H., Lunz, R., Doyle, S., and Segall, J. (1994). Mutation of the SPS1-encoded protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to defects in transcription and morphology during spore formation. *Genes Dev* 8, 2162-2175.
- Gallego, C., Gari, E., Colomina, N., Herrero, E., and Aldea, M. (1997). The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J* 16, 7196-7206.
- Garreau, H., Hasan, R.N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., and Jacquet, M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 146 ( Pt 9), 2113-2120.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.
- Gauss, R., Trautwein, M., Sommer, T., and Spang, A. (2005). New modules for the repeated internal and N-terminal epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22, 1-12.
- Gimeno, C.J., and Fink, G.R. (1992). The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* 257, 626.
- Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077-1090.
- Giots, F., Donaton, M.C., and Thevelein, J.M. (2003). Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 47, 1163-1181.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563-547.
- Goldmark, J.P., Fazio, T.G., Estep, P.W., Church, G.M., and Tsukiyama, T. (2000). The Isw2 chromatin remodeling complex represses early meiotic genes upon recruitment by Ume6p. *Cell* 103, 423-433.
- Gordon, O., Taxis, C., Keller, P.J., Benjak, A., Stelzer, E.H., Simchen, G., and Knop, M. (2006). Nud1p, the yeast homolog of Centriolin, regulates spindle pole body inheritance in meiosis. *Embo J* 25, 3856-3868.

- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., Ruis, H., and Schuller, C. (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* 12, 586-597.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E.L., Ammerer, G., Ruis, H., and Schuller, C. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J* 21, 135-144.
- Gotz, R., Gnann, A., and Zimmermann, F.K. (1999). Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* 15, 855-864.
- Granger, D.L., Perfect, J.R., and Durack, D.T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans*. Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *J Clin Invest* 76, 508-516.
- Granot, D., Margolskee, J.P., and Simchen, G. (1989). A long region upstream of the IME1 gene regulates meiosis in yeast. *Mol Gen Genet* 218, 308-314.
- Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., and Werner-Washburne, M. (2004). "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 187-206.
- Gray, M., Piccirillo, S., Purnapatre, K., Schneider, B.L., and Honigberg, S.M. (2008). Glucose induction pathway regulates meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* in part by controlling turnover of Ime2p meiotic kinase. *FEMS Yeast Res* 8, 676-684.
- Griffioen, G., Branduardi, P., Ballarini, A., Anghileri, P., Norbeck, J., Baroni, M.D., and Ruis, H. (2001). Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Mol Cell Biol* 21, 511-523.
- Griffioen, G., Mager, W.H., and Planta, R.J. (1994). Nutritional upshift response of ribosomal protein gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 123, 137-144.
- Griffioen, G., Swinnen, S., and Thevelein, J.M. (2003). Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit. *J Biol Chem* 278, 23460-23471.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30, e23.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinbauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24, 2519-2524.
- Guttmann-Raviv, N., Martin, S., and Kassir, Y. (2002). Ime2, a meiosis-specific kinase in yeast, is required for destabilization of its transcriptional activator, Ime1. *Mol Cell Biol* 22, 2047-2056.
- Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A., and Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem* 257, 2543-2548.
- Hall, R.A., De Sordi, L., Maccallum, D.M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J.W., Robinson, G.K., Levin, L.R., Buck, J., Wang, Y., *et al.* (2010). CO(2) acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 6, e1001193.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Harashima, T., and Heitman, J. (2002). The Galpha protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic Gbeta subunits. *Mol Cell* 10, 163-173.

- Hardwick, J.S., Kuruvilla, F.G., Tong, J.K., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 14866-14870.
- Hartley, J.L., and Donelson, J.E. (1980). Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* *286*, 860-865.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., Pringle, J.R., and Reid, B.J. (1974). Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* *183*, 46-51.
- Hartwell, L.H., Culotti, J., and Reid, B. (1970). Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *66*, 352-359.
- Hayashi, M., Ohkuni, K., and Yamashita, I. (1998a). Control of division arrest and entry into meiosis by extracellular alkalinisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 905-913.
- Hayashi, M., Ohkuni, K., and Yamashita, I. (1998b). An extracellular meiosis-promoting factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 617-622.
- Hedbacker, K., Townley, R., and Carlson, M. (2004). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Mol Cell Biol* *24*, 1836-1843.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* *253*, 905-909.
- Herruer, M.H., Mager, W.H., Woudt, L.P., Nieuwint, R.T., Wassenaar, G.M., Groeneveld, P., and Planta, R.J. (1987). Transcriptional control of yeast ribosomal protein synthesis during carbon-source upshift. *Nucleic Acids Res* *15*, 10133-10144.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* *67*, 425-479.
- Heywood, P., and Magee, P.T. (1976). Meiosis in protists. Some structural and physiological aspects of meiosis in algae, fungi, and protozoa. *Bacteriol Rev* *40*, 190-240.
- Hlavata, L., and Nystrom, T. (2003). Ras proteins control mitochondrial biogenesis and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol (Praha)* *48*, 725-730.
- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* *30*, 405-439.
- Hoekstra, M.F., Liskay, R.M., Ou, A.C., DeMaggio, A.J., Burbee, D.G., and Heffron, F. (1991). HRR25, a putative protein kinase from budding yeast: association with repair of damaged DNA. *Science* *253*, 1031-1034.
- Hoffman, C.S. (2005). Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* *4*, 495-503.
- Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8839-8843.
- Honigberg, S.M., and Lee, R.H. (1998). Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *18*, 4548-4555.
- Honigberg, S.M., and Purnapatre, K. (2003). Signal pathway integration in the switch from the mitotic cell cycle to meiosis in yeast. *J Cell Sci* *116*, 2137-2147.
- Howard, S.C., Hester, A., and Herman, P.K. (2003). The Ras/PKA signaling pathway may control RNA polymerase II elongation via the Spt4p/Spt5p complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *165*, 1059-1070.
- Hoyt, M.A. (1994). Cellular roles of kinesin and related proteins. *Curr Opin Cell Biol* *6*, 63-68.

- Hoyt, M.A., He, L., Loo, K.K., and Saunders, W.S. (1992). Two *Saccharomyces cerevisiae* kinesin-related gene products required for mitotic spindle assembly. *J Cell Biol* 118, 109-120.
- Huang, L.S., Doherty, H.K., and Herskowitz, I. (2005). The Smk1p MAP kinase negatively regulates Gsc2p, a 1,3-beta-glucan synthase, during spore wall morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12431-12436.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Inoki, K., Ouyang, H., Li, Y., and Guan, K.L. (2005). Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 79-100.
- Iwamoto, M.A., Fairclough, S.R., Rudge, S.A., and Engebrecht, J. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Sps1p regulates trafficking of enzymes required for spore wall synthesis. *Eukaryot Cell* 4, 536-544.
- Jacquet, M., Renault, G., Lallet, S., De Mey, J., and Goldbeter, A. (2003). Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 161, 497-505.
- Jaiswal, B.S., and Conti, M. (2001). Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 276, 31698-31708.
- Janbon, G. (2004). *Cryptococcus neoformans* capsule biosynthesis and regulation. *FEMS Yeast Res* 4, 765-771.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., *et al.* (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947-962.
- Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2005). Drag&Drop cloning in yeast. *Gene* 344, 43-51.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23, 403-405.
- Jiang, R., and Carlson, M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* 17, 2099-2106.
- Johnston, G.C., Pringle, J.R., and Hartwell, L.H. (1977). Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp Cell Res* 105, 79-98.
- Johnston, M., and Carlson, M. (1992). 5 Regulation of Carbon and Phosphate Utilization.
- Jones, S., Vignais, M.L., and Broach, J.R. (1991). The CDC25 protein of *Saccharomyces cerevisiae* promotes exchange of guanine nucleotides bound to ras. *Mol Cell Biol* 11, 2641-2646.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J.L., Bretkreutz, B.J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395-400.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* 18, 2491-2505.
- Jorgensen, P., and Tyers, M. (2004). How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* 14, R1014-1027.
- Jungbluth, M., Renicke, C., and Taxis, C. (2010). Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Syst Biol* 4, 176.



- Kadosh, D., and Struhl, K. (1998). Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev* 12, 797-805.
- Kassir, Y., Adir, N., Boger-Nadjar, E., Raviv, N.G., Rubin-Bejerano, I., Sagee, S., and Shenhar, G. (2003). Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int Rev Cytol* 224, 111-171.
- Kassir, Y., Granot, D., and Simchen, G. (1988). IME1, a positive regulator gene of meiosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 52, 853-862.
- Kataoka, T., Broek, D., and Wigler, M. (1985). DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* 43, 493-505.
- Kataoka, T., Powers, S., McGill, C., Fasano, O., Strathern, J., Broach, J., and Wigler, M. (1984). Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell* 37, 437-445.
- Kirschner, M. (1999). Intracellular proteolysis. *Trends Cell Biol* 9, M42-45.
- Klengel, T., Liang, W.J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schroppel, K., Naglik, J.R., Eckert, S.E., Mogensen, E.G., Haynes, K., Tuite, M.F., *et al.* (2005). Fungal adenylyl cyclase integrates CO<sub>2</sub> sensing with cAMP signaling and virulence. *Curr Biol* 15, 2021-2026.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: More tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Knop, M., and Strasser, K. (2000). Role of the spindle pole body of yeast in mediating assembly of the prospore membrane during meiosis. *EMBO J* 19, 3657-3667.
- Kornberg, H.L. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem J* 99, 1-11.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W., Donaton, M.C., Van Dijck, P., Winderickx, J., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M. (1999). A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol Microbiol* 32, 1002-1012.
- Kraakman, L.S., Griffioen, G., Zerp, S., Groeneveld, P., Thevelein, J.M., Mager, W.H., and Planta, R.J. (1993). Growth-related expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 239, 196-204.
- Krisak, L., Strich, R., Winters, R.S., Hall, J.P., Mallory, M.J., Kreitzer, D., Tuan, R.S., and Winter, E. (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 8, 2151-2161.
- Kruckeberg, A.L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 166, 283-292.
- Kubler, E., Mosch, H.U., Rupp, S., and Lisanti, M.P. (1997). Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 272, 20321-20323.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585-596.
- Kupiec, M., Byers, B., Esposito, R.E., and Mitchell, A.P. (1997). 11 Meiosis and Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Kuret, J., Johnson, K.E., Nicolette, C., and Zoller, M.J. (1988). Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cAMP-dependent protein kinase. Isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J Biol Chem* 263, 9149-9154.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamb, T.M., Xu, W., Diamond, A., and Mitchell, A.P. (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem* 276, 1850-1856.
- Leadsham, J.E., and Gourlay, C.W. (2010). cAMP/PKA signaling balances respiratory activity with mitochondria dependent apoptosis via transcriptional regulation. *BMC Cell Biol* 11, 92.
- Leadsham, J.E., Miller, K., Ayscough, K.R., Colombo, S., Martegani, E., Sudbery, P., and Gourlay, C.W. (2009). Whi2p links nutritional sensing to actin-dependent Ras-cAMP-PKA regulation and apoptosis in yeast. *J Cell Sci* 122, 706-715.
- Leberer, E., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (1997). Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr Opin Genet Dev* 7, 59-66.
- Lee, R.H., and Honigberg, S.M. (1996). Nutritional regulation of late meiotic events in *Saccharomyces cerevisiae* through a pathway distinct from initiation. *Mol Cell Biol* 16, 3222-3232.
- Lee, T.I., Rinaldi, N.J., Robert, F., Odom, D.T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G.K., Hannett, N.M., Harbison, C.T., Thompson, C.M., Simon, I., *et al.* (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 298, 799-804.
- Levine, K., Huang, K., and Cross, F.R. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins differ in their intrinsic functional specificities. *Mol Cell Biol* 16, 6794-6803.
- Lo, H.J., Kohler, J.R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., and Fink, G.R. (1997). Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939-949.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10, 457-468.
- Lorenz, M.C., and Fink, G.R. (2001). The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. *Nature* 412, 83-86.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J. (1997). Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein alpha homolog. *EMBO J* 16, 7008-7018.
- Lorenz, M.C., Pan, X., Harashima, T., Cardenas, M.E., Xue, Y., Hirsch, J.P., and Heitman, J. (2000). The G protein-coupled receptor *gpr1* is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 154, 609-622.
- Lundh, F., Mouillon, J.M., Samyn, D., Stadler, K., Popova, Y., Lagerstedt, J.O., Thevelein, J.M., and Persson, B.L. (2009). Molecular mechanisms controlling phosphate-induced downregulation of the yeast Pho84 phosphate transporter. *Biochemistry* 48, 4497-4505.
- Makuc, J., Paiva, S., Schauen, M., Kramer, R., Andre, B., Casal, M., Leao, C., and Boles, E. (2001). The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast* 18, 1131-1143.
- Malathi, K., Xiao, Y., and Mitchell, A.P. (1997). Interaction of yeast repressor-activator protein Ume6p with glycogen synthase kinase 3 homolog Rim1p. *Mol Cell Biol* 17, 7230-7236.
- Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., and O'Shea, E.K. (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14315-14322.
- Marshall, M.S., Gibbs, J.B., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S. (1987). Regulatory function of the *Saccharomyces cerevisiae* RAS C-terminus. *Mol Cell Biol* 7, 2309-2315.

- Martin, D.E., and Hall, M.N. (2005). The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 17, 158-166.
- Martin, D.E., Soulard, A., and Hall, M.N. (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* 119, 969-979.
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* 15, 2227-2235.
- Masuda, S., and Ono, T.A. (2005). Adenylyl cyclase activity of Cya1 from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 is inhibited by bicarbonate. *J Bacteriol* 187, 5032-5035.
- Matsumoto, K., Uno, I., and Ishikawa, T. (1983). Initiation of meiosis in yeast mutants defective in adenylyl cyclase and cyclic AMP-dependent protein kinase. *Cell* 32, 417-423.
- Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y., and Ishikawa, T. (1982). Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylyl cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2355-2359.
- Matsuura, A., Treinin, M., Mitsuzawa, H., Kassir, Y., Uno, I., and Simchen, G. (1990). The adenylyl cyclase/protein kinase cascade regulates entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* through the gene IME1. *EMBO J* 9, 3225-3232.
- Mbonyi, K., Beullens, M., Detremere, K., Geerts, L., and Thevelein, J.M. (1988). Requirement of one functional RAS gene and inability of an oncogenic ras variant to mediate the glucose-induced cyclic AMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 3051-3057.
- McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* 276, 36460-36466.
- McCord, R., Pierce, M., Xie, J., Wonkatal, S., Mickel, C., and Vershon, A.K. (2003). Rfm1, a novel tethering factor required to recruit the Hst1 histone deacetylase for repression of middle sporulation genes. *Mol Cell Biol* 23, 2009-2016.
- McDonald, C.M., Wagner, M., Dunham, M.J., Shin, M.E., Ahmed, N.T., and Winter, E. (2009). The Ras/cAMP pathway and the CDK-like kinase Ime2 regulate the MAPK Smk1 and spore morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 181, 511-523.
- McGrath, J.P., Jentsch, S., and Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J* 10, 227-236.
- McNabb, D.S., Xing, Y., and Guarente, L. (1995). Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev* 9, 47-58.
- Mitchell, A.P. (1994). Control of meiotic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 58, 56-70.
- Mitchell, A.P., Driscoll, S.E., and Smith, H.E. (1990). Positive control of sporulation-specific genes by the IME1 and IME2 products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 2104-2110.
- Mitchell, A.P., and Herskowitz, I. (1986). Activation of meiosis and sporulation by repression of the RME1 product in yeast. *Nature* 319, 738-742.
- Mitts, M.R., Bradshaw-Rouse, J., and Heideman, W. (1991). Interactions between adenylyl cyclase and the yeast GTPase-activating protein IRA1. *Mol Cell Biol* 11, 4591-4598.
- Mizuno, T., Nakazawa, N., Remgsamrarn, P., Kunoh, T., Oshima, Y., and Harashima, S. (1998). The Tup1-Ssn6 general repressor is involved in repression of IME1 encoding a transcriptional activator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 33, 239-247.

- Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., *et al.* (2004). Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell* *118*, 31-44.
- Moens, P.B. (1971). Fine structure of ascospore development in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* *17*, 507-510.
- Moens, P.B., and Rapport, E. (1971). Spindles, spindle plaques, and meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen). *J Cell Biol* *50*, 344-361.
- Mogk, A., Schmidt, R., and Bukau, B. (2007). The N-end rule pathway for regulated proteolysis: prokaryotic and eukaryotic strategies. *Trends Cell Biol* *17*, 165-172.
- Moir, R.D., Lee, J., Haeusler, R.A., Desai, N., Engelke, D.R., and Willis, I.M. (2006). Protein kinase A regulates RNA polymerase III transcription through the nuclear localization of Maf1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 15044-15049.
- Mollapour, M., and Piper, P.W. (2007). Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol* *27*, 6446-6456.
- Moreno-Borchart, A.C., and Knop, M. (2003). Prospore membrane formation: how budding yeast gets shaped in meiosis. *Microbiol Res* *158*, 83-90.
- Mosch, H.U., Kubler, E., Krappmann, S., Fink, G.R., and Braus, G.H. (1999). Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *10*, 1325-1335.
- Mosch, H.U., Roberts, R.L., and Fink, G.R. (1996). Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 5352-5356.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* *360*, 597-599.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., Nakamura, S., Arai, K., Matsumoto, K., and Kaziro, Y. (1988). Isolation of a second yeast *Saccharomyces cerevisiae* gene (GPA2) coding for guanine nucleotide-binding regulatory protein: studies on its structure and possible functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 1374-1378.
- Neiman, A.M. (1998). Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. *J Cell Biol* *140*, 29-37.
- Neiman, A.M. (2005). Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *69*, 565-584.
- Nickas, M.E., Diamond, A.E., Yang, M.J., and Neiman, A.M. (2004). Regulation of spindle pole function by an intermediary metabolite. *Mol Biol Cell* *15*, 2606-2616.
- Nickas, M.E., Schwartz, C., and Neiman, A.M. (2003). Ady4p and Spo74p are components of the meiotic spindle pole body that promote growth of the prospore membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* *2*, 431-445.
- Nikawa, J., Sass, P., and Wigler, M. (1987). Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *7*, 3629-3636.
- Ohkuni, K., Hayashi, M., and Yamashita, I. (1998). Bicarbonate-mediated social communication stimulates meiosis and sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 623-631.

- Ohkuni, K., and Yamashita, I. (2000). A transcriptional autoregulatory loop for KIN28-CCL1 and SRB10-SRB11, each encoding RNA polymerase II CTD kinase-cyclin pair, stimulates the meiotic development of *S. cerevisiae*. *Yeast* 16, 829-846.
- Olesen, J.T., and Guarente, L. (1990). The HAP2 subunit of yeast CCAAT transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and DNA recognition: model for the HAP2/3/4 complex. *Genes Dev* 4, 1714-1729.
- Ordiz, I., Herrero, P., Rodicio, R., and Moreno, F. (1996). Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits Tpk1 and Tpk2. *FEBS Lett* 385, 43-46.
- Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C., and Casal, M. (2004). Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 201-210.
- Pak, J., and Segall, J. (2002a). Regulation of the premiddle and middle phases of expression of the NDT80 gene during sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22, 6417-6429.
- Pak, J., and Segall, J. (2002b). Role of Ndt80, Sum1, and Swe1 as targets of the meiotic recombination checkpoint that control exit from pachytene and spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22, 6430-6440.
- Pan, X., Harashima, T., and Heitman, J. (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 3, 567-572.
- Parviz, F., and Heideman, W. (1998). Growth-independent regulation of CLN3 mRNA levels by nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180, 225-230.
- Pauli, A., Althoff, F., Oliveira, R.A., Heidmann, S., Schuldiner, O., Lehner, C.F., Dickson, B.J., and Nasmyth, K. (2008). Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. *Dev Cell* 14, 239-251.
- Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., and De Virgilio, C. (2003). TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell* 12, 1607-1613.
- Peeters, T., Louwet, W., Gelade, R., Nauwelaers, D., Thevelein, J.M., and Versele, M. (2006). Kelch-repeat proteins interacting with the Galpha protein Gpa2 bypass adenylate cyclase for direct regulation of protein kinase A in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13034-13039.
- Pereira, G., Tanaka, T.U., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (2001). Modes of spindle pole body inheritance and segregation of the Bfa1p-Bub2p checkpoint protein complex. *EMBO J* 20, 6359-6370.
- Peterson, J.B., Gray, R.H., and Ris, H. (1972). Meiotic spindle plaques in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 53, 837-841.
- Petronczki, M., Matos, J., Mori, S., Gregan, J., Bogdanova, A., Schwickart, M., Mechtler, K., Shirahige, K., Zachariae, W., and Nasmyth, K. (2006). Monopolar attachment of sister kinetochores at meiosis I requires casein kinase I. *Cell* 126, 1049-1064.
- Piccirillo, S., White, M.G., Murphy, J.C., Law, D.J., and Honigberg, S.M. (2010). The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies. *Genetics* 184, 707-716.
- Pichova, A., Vondrakova, D., and Breitenbach, M. (1997). Mutants in the *Saccharomyces cerevisiae* RAS2 gene influence life span, cytoskeleton, and regulation of mitosis. *Can J Microbiol* 43, 774-781.
- Pickart, C.M., and Cohen, R.E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-187.
- Piekarska, I., Rytka, J., and Rempola, B. (2010). Regulation of sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol* 57, 241-250.

- Pierce, M., Benjamin, K.R., Montano, S.P., Georgiadis, M.M., Winter, E., and Vershon, A.K. (2003). Sum1 and Ndt80 proteins compete for binding to middle sporulation element sequences that control meiotic gene expression. *Mol Cell Biol* 23, 4814-4825.
- Pinkham, J.L., and Guarente, L. (1985). Cloning and molecular analysis of the HAP2 locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 5, 3410-3416.
- Pope, B., and Kent, H.M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 24, 536-537.
- Primig, M., Williams, R.M., Winzeler, E.A., Tevzadze, G.G., Conway, A.R., Hwang, S.Y., Davis, R.W., and Esposito, R.E. (2000). The core meiotic transcriptome in budding yeasts. *Nat Genet* 26, 415-423.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.
- Ptacek, J., and Snyder, M. (2006). Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet* 22, 545-554.
- Purnapatre, K., Piccirillo, S., Schneider, B.L., and Honigberg, S.M. (2002). The CLN3/SWI6/CLN2 pathway and SNF1 act sequentially to regulate meiotic initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 7, 675-691.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., and Entian, K.D. (1997). Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol Cell Biol* 17, 2502-2510.
- Raught, B., Gingras, A.C., and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7037-7044.
- Ravid, T., and Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 679-690.
- Rocha, C.R., Schroppe, K., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Taylor, B.N., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Leberer, E. (2001). Signaling through adenylyl cyclase is essential for hyphal growth and virulence in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 12, 3631-3643.
- Rolland, F., De Winde, J.H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J.M., and Winderickx, J. (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol Microbiol* 38, 348-358.
- Ronne, H. (1995). Glucose repression in fungi. *Trends Genet* 11, 12-17.
- Roosen, J., Engelen, K., Marchal, K., Mathys, J., Griffioen, G., Cameroni, E., Thevelein, J.M., De Virgilio, C., De Moor, B., and Winderickx, J. (2005). PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol* 55, 862-880.
- Rose, K., Rudge, S.A., Frohman, M.A., Morris, A.J., and Engebrecht, J. (1995). Phospholipase D signaling is essential for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12151-12155.
- Rubin-Bejerano, I., Sagee, S., Friedman, O., Pnueli, L., and Kassir, Y. (2004). The in vivo activity of Ime1, the key transcriptional activator of meiosis-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is inhibited by the cyclic AMP/protein kinase A signal pathway through the glycogen synthase kinase 3-beta homolog Rim11. *Mol Cell Biol* 24, 6967-6979.
- Rudge, S.A., Morris, A.J., and Engebrecht, J. (1998). Relocalization of phospholipase D activity mediates membrane formation during meiosis. *J Cell Biol* 140, 81-90.
- Sagee, S., Sherman, A., Shenhar, G., Robzyk, K., Ben-Doy, N., Simchen, G., and Kassir, Y. (1998). Multiple and distinct activation and repression sequences mediate the regulated transcription of IME1,

- a transcriptional activator of meiosis-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18, 1985-1995.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24, 104-108.
- Sari, F., Heinrich, M., Meyer, W., Braus, G.H., and Irniger, S. (2008). The C-terminal region of the meiosis-specific protein kinase Ime2 mediates protein instability and is required for normal spore formation in budding yeast. *J Mol Biol* 378, 31-43.
- Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T., and Wigler, M. (1986). Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9303-9307.
- Schmitt, A.P., and McEntee, K. (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5777-5782.
- Schneper, L., Duvel, K., and Broach, J.R. (2004). Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7, 624-630.
- Schuller, H.J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43, 139-160.
- Shah, J.C., and Clancy, M.J. (1992). IME4, a gene that mediates *MAT* and nutritional control of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 1078-1086.
- Shenhar, G., and Kassir, Y. (2001). A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 1603-1612.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350, 3-41.
- Shimoda, C. (2004). Forespore membrane assembly in yeast: coordinating SPBs and membrane trafficking. *J Cell Sci* 117, 389-396.
- Shin, M.E., Skokotas, A., and Winter, E. (2010). The Cdk1 and Ime2 protein kinases trigger exit from meiotic prophase in *Saccharomyces cerevisiae* by inhibiting the Sum1 transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* 30, 2996-3003.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Simchen, G. (2009). Commitment to meiosis: what determines the mode of division in budding yeast? *Bioessays* 31, 169-177.
- Simchen, G., Pinon, R., and Salts, Y. (1972). Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*: premeiotic DNA synthesis, readiness and commitment. *Exp Cell Res* 75, 207-218.
- Smets, B., Ghillebert, R., De Snijder, P., Binda, M., Swinnen, E., De Virgilio, C., and Winderickx, J. (2010). Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 56, 1-32.
- Smith, H.E., Su, S.S., Neigeborn, L., Driscoll, S.E., and Mitchell, A.P. (1990). Role of IME1 expression in regulation of meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 6103-6113.
- Smits, G.J., van den Ende, H., and Klis, F.M. (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147, 781-794.
- Sopko, R., Raithatha, S., and Stuart, D. (2002). Phosphorylation and maximal activity of *Saccharomyces cerevisiae* meiosis-specific transcription factor Ndt80 is dependent on Ime2. *Mol Cell Biol* 22, 7024-7040.

- Spadaccini, R., Reidt, U., Dybkov, O., Will, C., Frank, R., Stier, G., Corsini, L., Wahl, M.C., Luhrmann, R., and Sattler, M. (2006). Biochemical and NMR analyses of an SF3b155-p14-U2AF-RNA interaction network involved in branch point definition during pre-mRNA splicing. *RNA* 12, 410-425.
- Sprague, G.F., Cullen, P.J., and Goehring, A.S. (2004). Yeast signal transduction: regulation and interface with cell biology. *Adv Exp Med Biol* 547, 91-105.
- Stack, J.H., Whitney, M., Rodems, S.M., and Pollok, B.A. (2000). A ubiquitin-based tagging system for controlled modulation of protein stability. *Nat Biotechnol* 18, 1298-1302.
- Steber, C.M., and Esposito, R.E. (1995). UME6 is a central component of a developmental regulatory switch controlling meiosis-specific gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12490-12494.
- Steebhorn, C., Litvin, T.N., Levin, L.R., Buck, J., and Wu, H. (2005). Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol* 12, 32-37.
- Strich, R., Surosky, R.T., Steber, C., Dubois, E., Messenguy, F., and Esposito, R.E. (1994). UME6 is a key regulator of nitrogen repression and meiotic development. *Genes Dev* 8, 796-810.
- Strijbis, K., and Distel, B. (2010). Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryot Cell* 9, 1809-1815.
- Su, S.S., and Mitchell, A.P. (1993). Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* 133, 67-77.
- Suzuki, T., and Varshavsky, A. (1999). Degradation signals in the lysine-asparagine sequence space. *EMBO J* 18, 6017-6026.
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S., and Bauer, F.F. (2006). Regulation of respiratory growth by Ras: the glyoxylate cycle mutant, *cit2Delta*, is suppressed by *RAS2*. *Curr Genet* 50, 161-171.
- Takeuchi, J., Chen, H., and Coffino, P. (2007). Proteasome substrate degradation requires association plus extended peptide. *EMBO J* 26, 123-131.
- Takeuchi, J., Chen, H., Hoyt, M.A., and Coffino, P. (2008). Structural elements of the ubiquitin-independent proteasome degron of ornithine decarboxylase. *Biochem J* 410, 401-407.
- Tanaka, K., Matsumoto, K., and Toh, E.A. (1989). *IRA1*, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9, 757-768.
- Tanaka, K., Nakafuku, M., Tamanoi, F., Kaziro, Y., Matsumoto, K., and Toh-e, A. (1990). *IRA2*, a second gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein with a domain homologous to mammalian ras GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol* 10, 4303-4313.
- Taxis, C., Keller, P., Kavagiou, Z., Jensen, L.J., Colombelli, J., Bork, P., Stelzer, E.H., and Knop, M. (2005). Spore number control and breeding in *Saccharomyces cerevisiae*: a key role for a self-organizing system. *J Cell Biol* 171, 627-640.
- Taxis, C., Stier, G., Spadaccini, R., and Knop, M. (2009). Efficient protein depletion by genetically controlled deprotection of a dormant N-degron. *Mol Syst Biol* 5, 267.
- Teixeira, M.C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Mira, N.P., Alenquer, M., Freitas, A.T., Oliveira, A.L., and Sa-Correia, I. (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 34, D446-451.
- Tesfaigzi, J., Smith-Harrison, W., and Carlson, D.M. (1994). A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *Biotechniques* 17, 268-269.



- Thevelein, J.M. (1991). Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol Microbiol* 5, 1301-1307.
- Thevelein, J.M. (1994). Signal transduction in yeast. *Yeast* 10, 1753-1790.
- Thevelein, J.M., and de Winde, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33, 904-918.
- Thevelein, J.M., Gelade, R., Holsbeeks, I., Lagatie, O., Popova, Y., Rolland, F., Stolz, F., Van de Velde, S., Van Dijck, P., Vandormael, P., *et al.* (2005). Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem Soc Trans* 33, 253-256.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94-102.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., and Wigler, M. (1988). SCH9, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a protein distinct from, but functionally and structurally related to, cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits. *Genes Dev* 2, 517-527.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G., and Wigler, M. (1987a). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 1371-1377.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K., and Wigler, M. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40, 27-36.
- Tudisca, V., Recouvreux, V., Moreno, S., Boy-Marcotte, E., Jacquet, M., and Portela, P. (2010). Differential localization to cytoplasm, nucleus or P-bodies of yeast PKA subunits under different growth conditions. *Eur J Cell Biol* 89, 339-348.
- Tyers, M., Tokiwa, G., Nash, R., and Futcher, B. (1992). The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J* 11, 1773-1784.
- Uno, I., Matsumoto, K., Hirata, A., and Ishikawa, T. (1985). Outer plaque assembly and spore encapsulation are defective during sporulation of adenylate cyclase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 100, 1854-1862.
- Uno, I., Oshima, T., Hirata, A., and Ishikawa, T. (1990). The functional domain of adenylate cyclase associated with entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 172, 102-109.
- Vallier, L.G., and Carlson, M. (1994). Synergistic release from glucose repression by *mig1* and *ssn* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 49-54.
- van der Plaats, J.B. (1974). Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 56, 580-587.
- Van Nuland, A., Vandormael, P., Donaton, M., Alenquer, M., Lourenco, A., Quintino, E., Versele, M., and Thevelein, J.M. (2006). Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Mol Microbiol* 59, 1485-1505.
- van Roermund, C.W., Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R.J., and Tabak, H.F. (1995). The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J* 14, 3480-3486.
- Vanhalewyn, M., Dumortier, F., Debast, G., Colombo, S., Ma, P., Winderickx, J., Van Dijck, P., and Thevelein, J.M. (1999). A mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, *Cyr1K1876M*,

- specifically affects glucose- and acidification-induced cAMP signalling and not the basal cAMP level. *Mol Microbiol* 33, 363-376.
- Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12142-12149.
- Versele, M., de Winde, J.H., and Thevelein, J.M. (1999). A novel regulator of G protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J* 18, 5577-5591.
- Versele, M., Lemaire, K., and Thevelein, J.M. (2001). Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep* 2, 574-579.
- Vershon, A.K., and Pierce, M. (2000). Transcriptional regulation of meiosis in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 12, 334-339.
- Vidan, S., and Mitchell, A.P. (1997). Stimulation of yeast meiotic gene expression by the glucose-repressible protein kinase Rim15p. *Mol Cell Biol* 17, 2688-2697.
- Vincent, O., and Carlson, M. (1998). Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J* 17, 7002-7008.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793-1808.
- Wagner, M., Briza, P., Pierce, M., and Winter, E. (1999). Distinct steps in yeast spore morphogenesis require distinct SMK1 MAP kinase thresholds. *Genetics* 151, 1327-1340.
- Walsh, R.B., Kawasaki, G., and Fraenkel, D.G. (1983). Cloning of genes that complement yeast hexokinase and glucokinase mutants. *J Bacteriol* 154, 1002-1004.
- Wang, Y., Pierce, M., Schneper, L., Guldal, C.G., Zhang, X., Tavazoie, S., and Broach, J.R. (2004). Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *PLoS Biol* 2, E128.
- Watson, D.C., and Berry, D.R. (1977). Fluctuation in the levels of intracellular and extracellular cAMP during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 1, 83-86.
- Weber, J.M., Irlbacher, H., and Ehrenhofer-Murray, A.E. (2008). Control of replication initiation by the Sum1/Rfm1/Hst1 histone deacetylase. *BMC Mol Biol* 9, 100.
- Weissman, A.M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169-178.
- Werner-Washburne, M., Brown, D., and Braun, E. (1991). Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell. *J Biol Chem* 266, 19704-19709.
- Wesp, A., Prinz, S., and Fink, G.R. (2001). Conservative duplication of spindle poles during meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 183, 2372-2375.
- Wigler, M., Field, J., Powers, S., Broek, D., Toda, T., Cameron, S., Nikawa, J., Michaeli, T., Colicelli, J., and Ferguson, K. (1988). Studies of RAS function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 53 Pt 2, 649-655.
- Willis, I.M., and Moir, R.D. (2007). Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends Biochem Sci* 32, 51-53.
- Wilson, W.A., Hawley, S.A., and Hardie, D.G. (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* 6, 1426-1434.

- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* *124*, 471-484.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem* *280*, 30697-30704.
- Xie, J., Pierce, M., Gailus-Durner, V., Wagner, M., Winter, E., and Vershon, A.K. (1999). Sum1 and Hst1 repress middle sporulation-specific gene expression during mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* *18*, 6448-6454.
- Xu, L., Ajimura, M., Padmore, R., Klein, C., and Kleckner, N. (1995). NDT80, a meiosis-specific gene required for exit from pachytene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *15*, 6572-6581.
- Xue, Y., Batlle, M., and Hirsch, J.P. (1998). GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J* *17*, 1996-2007.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* *42*, 27-81.
- Zaragoza, D., Ghavidel, A., Heitman, J., and Schultz, M.C. (1998). Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol* *18*, 4463-4470.
- Zaragoza, O., Fries, B.C., and Casadevall, A. (2003). Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO<sub>2</sub>. *Infect Immun* *71*, 6155-6164.
- Zeller, C.E., Parnell, S.C., and Dohlman, H.G. (2007). The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem* *282*, 25168-25176.
- Zenvirth, D., Loidl, J., Klein, S., Arbel, A., Shemesh, R., and Simchen, G. (1997). Switching yeast from meiosis to mitosis: double-strand break repair, recombination and synaptonemal complex. *Genes Cells* *2*, 487-498.
- Zhang, Z., and Reese, J.C. (2004). Redundant mechanisms are used by Ssn6-Tup1 in repressing chromosomal gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *279*, 39240-39250.
- Zinzalla, V., Graziola, M., Mastriani, A., Vanoni, M., and Alberghina, L. (2007). Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* *63*, 1482-1494.

# 7

## Lebenslauf

Die Seite 140 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

*In jede hohe Freude mischt sich eine Empfindung  
der Dankbarkeit.*

Marie von Ebner-Eschenbach (1830-1916),  
österreichische Schriftstellerin

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor anzufertigen und für die Übernahme des Erstgutachtens danken.

Prof. Dr. Uwe Maier danke ich für die Bereitschaft das Zweitgutachten anzufertigen. Ebenso bedanke ich mich bei ihm für die hervorragende Leitung des Graduiertenkollegs 1216, dem ich während meiner Promotion angehört habe.

Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Prof. Dr. Michael Bölker möchte ich für die Bereitschaft, meiner Prüfungskommission anzugehören, danken. Weiterhin danke ich ihnen für hilfreiche Ideen und Kommentare während der Besprechungen im Rahmen des GRK 1216.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Christof Taxis, der mich während meiner Promotion betreut hat. Ich habe wirklich keinen einzigen Augenblick erlebt, in dem Christof nicht ein offenes Ohr für Sorgen und Probleme hatte, die während einer Promotion „manchmal“ auftreten können. Weiterhin danke ich ihm für anregende Diskussionen, die meine Arbeit entscheidend voran gebracht haben.

Daniela Störmer möchte ich für ihre hervorragende technische Unterstützung danken. Besonders bedanke ich mich bei ihr für die nervenaufreibende Herstellung nicht weniger, wichtiger Hefestämme.

Diese Arbeit ist nicht umsonst meinen Eltern Rosi und Hans-Werner gewidmet. Ohne die moralische und finanzielle Unterstützung meiner Familie wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Ich möchte ihnen dafür danken, dass sie immer für mich da waren und mir so oft Mut zugesprochen haben. Des Öfteren hat mich der Aufenthalt zu Hause aufgebaut und dazu beigetragen, dass ich manche Tiefen überwinden konnte. Dieser Dank gilt auch meinem Bruder Dominik.

Ute und Wolfgang danke ich für die Versorgung mit allerlei Köstlichkeiten und viele schöne weinschwere Abende.

Ich möchte allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mösch für die schöne Arbeitsatmosphäre, tolle „Ausflüge“ auf internationale Fachtagungen, Spiele-Abende und ihre Diskussionsbereitschaft danken.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bölker danke ich für die tolle Nachbarschaft. Besonders den „Uni-Essern“ gilt mein Dank für lustige und kurzweilige

Mittagspausen. Britta danke ich für die TAXI-Fahrten nach Hause, Johannes für einige tolle Tipps zu bestimmten Experimenten.

Meinen langjährigen Freunden Marco, Guido, Jörg, Anja und dem Rest der Truppe möchte ich für die wirkungsvollen Zerstreuungen im Sauerland und für die schönen Jahre danken.

Nicht zuletzt danke ich dem Graduiertenkolleg 1216 der DFG für die finanzielle Unterstützung und für die Möglichkeit, im Rahmen von Tagungen und Seminaren auch mal über den Tellerrand schauen zu können. In diesem Rahmen möchte auch Frau Lucette Claudet, der „guten Seele des Grakos“, danken, die einen entscheidenden Anteil daran hat, dass das Graduiertenkolleg so gut funktioniert.

*Danke.*