

**Untersuchungen zur Lokalisation und Wirkung des viralen
K28 α -Toxins in Hefezellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Biologe
Thorsten Michael Hoffmann

Saarbrücken 2013

Tag des Kolloquiums: 25.10.2013

Dekan: Prof. Dr. Volkhard Helms

Prüfungsausschuss:

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriel Schlenstedt

Vorsitzender: Prof. Dr. Uli Kazmaier

Akad. Mitarbeiter: Dr. Frank Hannemann

„Man muß nur wollen und daran glauben, dann wird es gelingen.“

Ferdinand Graf von Zeppelin (1838 – 1917)

„It must be a strange world not being a scientist [...]”

Michio Kaku

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abstract	9
1 Einleitung.....	10
1.1 Der Zellzyklus von <i>S. cerevisiae</i>	10
1.1.1 Allgemeine Aspekte	10
1.1.2 Die G1/S-Transition.....	12
1.1.3 Der „anaphase-promoting-complex“ APC	13
1.1.4 Transkriptionelle Regulation des Zellzyklus am G1/S-Übergang	14
1.2 Der Transport von Proteinen in und aus dem Nukleus	15
1.2.1 Der Kernporenkomplex	15
1.2.2 Der nukleozytoplasmatische Transport.....	17
1.3 Das virale Killertoxin K28	18
1.3.1 Allgemeine Aspekte	18
1.3.2 Genetische Grundlagen des Killerphänotyps.....	20
1.3.3 Prozessierung und Sekretion	22
1.3.4 K28-Aufnahme und retrograder Transport	23
1.3.5 Immunität.....	24
1.3.6 Der K28 α -induzierte Zellzyklusarrest	25
1.3.7 Intrazelluläre Expression der toxischen α -Untereinheit.....	28
1.4 Ziele und Fragestellungen der Arbeit.....	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Organismen.....	30
2.1.1 Bakterien-Stämme	30
2.1.2 Hefe-Stämme	30
2.2 Plasmide	32
2.3 Oligonukleotide	36
2.4 Allgemeine Lösungen	38
2.5 Nährmedien und allgemeine Kulturbedingungen.....	38
2.5.1 Bakterien	38
2.5.2 Hefen.....	40
2.5.3 Dauerkulturen.....	41
2.6 Zellzahlbestimmung	42
2.6.1 Gesamtzellzahl.....	42
2.6.2 Optische Dichte	42
2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
2.7.1 Standard-PCR.....	43
2.7.2 SOE-PCR.....	44
2.7.3 Kolonie-PCR.....	44
2.8 TA-Klonierung	45
2.8.1 AccepTor TM -Klonierung	45
2.8.2 pYES2.1 TOPO [®] TA Expression Kit.....	45
2.9 Sequenzierung.....	46

2.10 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	46
2.10.1 Alkalische Lyse.....	46
2.10.2 Plasmid-Präparation mittels Plasmid-Miniprep Kit	47
2.11 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit	48
2.12 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	48
2.13 Restriktionsenzymatischer Verdau von Plasmid-DNA	49
2.14 Agarose-Gelelektrophorese	49
2.15 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	50
2.16 Ligation.....	51
2.17 Transformationsmethoden	51
2.17.1 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation.....	51
2.17.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mittels Lithiumacetat-Methode.....	52
2.18 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen	53
2.19 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	55
2.20 Western-Analyse.....	56
2.20.1 „Semi dry blotting“	56
2.20.2 Immunodetektion.....	57
2.20.3 „Stripping“ und „Reprobing“	58
2.20.4 Antikörper	58
2.21 Zellaufschluss	59
2.21.1 S80-Schnellaufschluss.....	59
2.21.2 Glasperlenaufschluss von Hefezellen	59
2.22 Herstellung von Toxinkonzentrat	60
2.23 Methylenblau-Agardiffusionstest (MBA).....	62
2.24 Sphäroplastierung.....	63
2.25 Toxininkubation	64
2.26 Serieller Verdünnungstest.....	65
2.27 Immunogold-Elektronenmikroskopie (IEM).....	66
2.28 Fluoreszenzmikroskopische Methoden.....	70
2.28.1 Fluoreszenzmikroskopie	70
2.28.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF)	71
2.28.3 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalyse (BiFC).....	73
2.29 RNA-Seq.....	73
2.29.1 Präparation von Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	73
2.29.2 Überprüfung der RNA-Qualität und -Konzentration	74
2.29.3 Probenvorbereitung, Sequenzierung, Auswertung	74
2.30 Chemikalien, Enzyme und „Kits“	76
3 Ergebnisse.....	77
3.1 Untersuchungen zur Kernlokalisierung von K28□	77
3.1.1 Gerichteter Kernimport bzw. -export von K28 α mittels Kernlokalisations- bzw. Kernexportsequenzen.....	78

3.1.2	Untersuchungen zur nukleären Lokalisation von K28 α durch mRFP-Fusionen	87
3.1.3	Mikroskopischer Nachweis von K28 α im Hefezellkern mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF).....	92
3.1.4	Lokalisationsbestimmung von K28 und K28 α mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie (IEM)	100
3.2	Einfluss von K28 α auf den Zellzyklus	110
3.2.1	Studien zur Interaktion zwischen K28 α und den Hefeproteinen Apc2p und Spt15p.....	111
3.2.2	Toxizitätsuntersuchungen zur Identifizierung K28-resistenter bzw. -hyper-sensitiver Deletionsmutanten der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	116
3.2.3	Überexpressionsstudien zur Identifikation möglicher K28-„Target“-Proteine.....	129
3.2.4	Transkriptomanalyse K28-behandelter Zellen mittels RNA-Seq.....	135
4	Diskussion	142
4.1	Bestimmung der terminalen Lokalisation von K28 α	143
4.2	Mechanismus des K28-induzierten Zellzyklusarrests	155
4.3	Modell zur K28-induzierten Hemmung der Transkriptionsmaschinerie	182
4.4	Ausblick.....	183
5	Zusammenfassung	186
6	Literatur.....	189
7	Danksagung.....	208
8	Anhang.....	210

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	GRAS	„generally recognized as safe“
Amp	Ampicillin	GST	Glutathion-S-Transferase
APC	"anaphase promoting complex"	GTE	Glukose-Tris-EDTA
APS	Ammoniumperoxodisulfat	GTP	Guanosintriphosphat
AS	Aminosäure	HA	Hämagglutinin
ATP	Adenosintriphosphat	HAT	Histon-Acetyltransferase
BiFC	"bimolecular fluorescence complementation"	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
bp	Basenpaare	HRP	"horseradish peroxidase"
BSA	Bovines Serumalbumin	IEM	Immunogold-Elektronenmikroskopie
CAK	"cyclin activating kinase"	IIF	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie
cDNA	"complementary DNA"	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
CDK	"cyclin dependent kinase"	kb	Kilobasenpaare
CDT	"cytolethal distending toxin"	kDa	Kilodalton
CK2	Casein Kinase 2	LB	„lysogeny broth“
CKI	"cyclin dependent kinase inhibitor"	MALDI	"matrix-assisted laser desorption/ionization"
CTD	Carboxy-terminale Domäne	MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
CTDK	CTD-Kinase	MBA	Methylenblauagar
d/o	"drop out"	MBF	"MCB binding factor"
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	MC	C-terminaler Teil von mCherry
DMSO	Dimethylsulfoxid	MCB	" <i>Mlu1</i> cell cycle box"
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MCS	„multiple cloning site“
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	MEN	"mitotic exit network"
ds	doppelsträngig	MN	N-terminaler Teil von mCherry
DTT	Dithiothreitol	MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	mRNA	"messenger RNA"
ER	Endoplasmatisches Retikulum	NE	"nuclear envelope"
ERAD	ER-assoziierte Degradation	NES	"nuclear export signal"
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat	NHEJ	"non-homologous end joining"
FSG	"fish skin gelatine"	NLS	"nuclear localization signal"
GAP	GTPase-aktivierendes Protein	NPC	"nuclear pore complex"
GDP	Guanosindiphosphat	nt	Nukleotid
GEF	"guanine nucleotide exchange factor"	NUP	Nukleoporin
GFP	grün fluoreszierendes Protein	OD	optische Dichte
GLB	„gel loading buffer“	ORF	"open reading frame"
GO	"Gene Ontology"		

PACR	„poxviral anaphase promoting complex regulator“	SOC	"super optimal broth with catabolicrepressor"
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	SOE	"splicing by overlapping extensions"
Paf1C	Paf1-Komplex	SP	Signalpeptidase
PaT	<i>Pichia acaciae</i> Toxin	SPB	"spindle pole body"
PBS	"phosphate buffered saline"	SV40	Simian-Virus 40
PCR	"polymerase chain reaction"	SWI/SNF	"Switch/Sucrose NonFermentable
PEG	Polyethylenglykol	TAF	"TBP-associated factor"
PGK	Phosphoglycerat-Kinase	TAP	"tandem affinity purification"
pH	"potentia hydrogenii"	TBP	"TATA-box binding protein"
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure)	TBS	„tris buffered saline“
PMKT	<i>Pichia membranifaciens</i> Killertoxin	TEM	Transmissionselektronenmikroskop
pptox	Präprotoxin	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
prä-RC	prä-Replikationskomplex	TEV	Tobacco Etch Virus
PVDF	Polyvinylidenfluorid	TF	Transkriptionsfaktor
Ran	Ras-related nuclear protein	THO/TREX	„suppressors of the transcription defects of hpr1Δ mutants by overexpression/Transcription and Export“
Ras	"rat sarcoma"	Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
RNA	Ribonukleinsäure	tRNA	Transfer-RNA
RNAPII	RNA-Polymerase II	UE	Untereinheit
ROS	"reactive oxygen species"	ü. N.	über Nacht
RPKM	"reads per kilobase of transcript per million mapped reads"	uORF	"upstream open reading frame"
rpm	Umdrehungen pro Minute	UTR	"untranslated region"
RSC	"remodel the structure of chromatin"	UV	Ultraviolett
RT	Raumtemperatur	V	Volt
RTA	Ricin Toxin A	v/v	"volume per volume"
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase	VLP	"virus like particle"
SAM	S-Adenosylmethionin	w/v	"weight per volume"
SAM	"significance analysis of microarrays"	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase	Y2H	"Yeast Two Hybrid"
SBF	"SCB binding factor"	YNB	„yeast nitrogen base“
SC	„synthetic complete“	YPD	„yeast peptone dextrose“
SCB	Swi4/Swi6 cell cycle box		
SCF	Skp, Cullin, F-box		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SGD	Saccharomyces genome database		
SNP	"single nucleotide polymorphism"		

Abstract

Das viral kodierte Killertoxin K28 ist ein heterodimeres A/B-Toxin, das bei sensitiven Hefezellen einen Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase induziert. Nach Bindung an die Zellwand und Translokation zum Sekundärrezeptor auf der Plasmamembran durchläuft das Toxin retrograd den Sekretionsweg über Golgi-Apparat und ER, aus dem es in das Zytoplasma retrotransloziert. Die Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit wird getrennt und K28 β proteasomal degradiert. Die zytotoxische α -Untereinheit von K28 entfaltet im Zellkern ihre letale Wirkung, was sich in einem Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase und einer irreversiblen Hemmung der DNA-Synthese äußert.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit richtete sich u.a. auf die Verifizierung der nukleären Lokalisation von K28 α . Die bisherigen, indirekten Hinweise auf einen Kernimport von K28 α wurden mittels forcierten Kernimport- und -exportstudien bestätigt und erweitert. Trotz vielfältiger Bemühungen gelang es nicht, K28 α durch mikroskopische Techniken direkt im Nukleus zu detektieren. Bei der näheren Charakterisierung des durch K28 induzierten Zellzyklusarrests konnten Apc2p und Spt15p mittels BiFC-Analyse als potentielle Interaktionspartner von K28 α *in vivo* bestätigt werden. Durch die Analyse von Deletionsmutanten sowie durch Überexpressionsstudien konnte ein Einfluss von K28 auf die Transkriptions-maschinerie nachgewiesen und durch eine globale Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq bestätigt werden.

The virally encoded killer toxin K28 is a heterodimeric A/B toxin that induces a cell cycle arrest at the transition from G1- to S-phase in sensitive yeast cells. After binding to the cell wall and translocation to the secondary receptor at the plasma membrane, the toxin travels the secretory pathway retrogradely through Golgi apparatus and ER from where it is retrotranslocated into the cytoplasm. The disulphide bond between the α - and β -subunit is reduced and K28 β is proteasomally degraded. The cytotoxic α -subunit of K28 exerts its lethal effect in the nucleus which is manifested by a G1/S cell cycle arrest and an irreversible inhibition of DNA synthesis.

The focus of the present work mainly addressed the verification of the nuclear localization of K28 α . Hitherto indirect evidence for a nuclear import of K28 α was confirmed and extended by forced nuclear import and export studies. Despite manifold efforts it was not possible to detect K28 α directly in the nucleus with microscopic techniques. By detailed characterization of the K28-induced cell cycle arrest, the potential interaction partners of K28 α , Apc2p and Spt15p, could be confirmed *in vivo* via BiFC analysis. The study of deletion mutants as well as overexpression studies verified the effect of K28 on the transcription machinery which was further confirmed by a global transcriptome analysis via RNA-Seq.

1 Einleitung

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird nicht nur seit tausenden Jahren zur Herstellung von Brot, Bier und Wein eingesetzt, sondern stellt auch innerhalb der molekular- und zellbiologischen Forschung den am besten charakterisierten, eukaryotischen Organismus dar (Sherman 2002). Das Genom von *S. cerevisiae* wurde bereits 1996 vollständig sequenziert (Goffeau *et al.* 1996), wodurch sich die Hefe zum wichtigsten Modellorganismus der Genomforschung etablierte. Hefezellen sind leicht kultivierbar und lassen sich aufgrund ihres haploiden Genoms und der Fähigkeit zur homologen Rekombination einfach genetisch manipulieren. Zudem wird *S. cerevisiae* als sicherer Organismus angesehen und besitzt den GRAS-Status („generally recognized as safe“). Diese und weitere Vorteile von Hefe als Modellorganismus in der Molekularbiologie führten dazu, dass eine Vielzahl zellulärer Mechanismen an Hefe aufgeklärt wurde. So wurden beispielsweise der Ablauf des eukaryotischen Zellzyklus, des Membrantransports, der Proteinsekretion und der Endozytose mit Hilfe von Hefe aufgeklärt. Etwa 50 % der Gene von *S. cerevisiae* haben Homologien zu menschlichen Genen (Botstein *et al.* 1997), sodass auch Funktionen von humanen Genen durch Komplementationsanalysen in *S. cerevisiae* untersucht werden können.

1.1 Der Zellzyklus von *S. cerevisiae*

1.1.1 Allgemeine Aspekte

Der Zellzyklus eukaryotischer Zellen stellt einen äußerst komplexen, streng regulierten Prozess dar, für dessen Erforschung Leland H. Hartwell, Timothy Hunt und Paul M. Nurse im Jahr 2001 den Nobelpreis für Medizin erhielten. Obwohl es sich um einen der komplexesten zellulären Mechanismen handelt, sind mittlerweile viele Abläufe bis zur molekularen Ebene aufgeklärt.

Grundsätzlich lässt sich der Zellzyklus in vier Phasen einteilen. In der G1-Phase („Gap“) bereitet sich die Zelle auf den Eintritt in einen neuen Zellzyklus vor. Sind die äußeren Bedingungen wie z. B. Nährstoffangebot und Temperatur günstig, überschreitet die Zelle den in *S. cerevisiae* als „Start“ bezeichneten G1-Kontrollpunkt und tritt in einen neuen Zellzyklus ein. Auf die G1-Phase folgt die S-Phase („Synthese“), in der der einfache Chromosomensatz durch Replikation der DNA verdoppelt wird. In der sich anschließenden G2-Phase wird die Mitose vorbereitet und die Zelle überprüft ein weiteres Mal, ob die Bedingungen für eine Zellteilung ausreichend sind. In der M-Phase („Mitose“) erfolgt die Trennung und Aufteilung

der homologen Chromosomen und schließlich die als Zytokinese bezeichnete Trennung von Mutter- und Tochterzelle. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten wird bei *S. cerevisiae* die Kernmembran während der Mitose nicht aufgelöst, weswegen sie als „geschlossene Mitose“ bezeichnet wird (Byers 1981, Güttinger *et al.* 2009). Bei ungünstigen Umweltbedingungen können die Zellen aus der G1-Phase in eine als G0 bezeichnete Ruhephase eintreten oder im Falle von diploiden Zellen die meiotische Sporulation einleiten. Haploide Zellen sind in der G1-Phase in der Lage, eine Pheromon-abhängige Paarung einzuleiten, die einen Zellzyklusarrest vor dem „Start“-Punkt zur Folge hat (Hartwell 1974).

Reguliert wird der Zellzyklus grundsätzlich durch Phosphorylierung, welche durch das Zusammenspiel zwischen Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK, „cyclin dependent kinase“) und deren aktivierenden Bindungspartnern, den Zyklinen erfolgt. In *S. cerevisiae* sind insgesamt sechs CDKs (Cdc28p, Srb10p, Kin28p, Ctk1p, Pho85p und Bur1p) bekannt, von denen nur Cdc28p (Cdk1p) direkt für die Zellzyklusregulation verantwortlich ist. Bei allen CDKs handelt es sich um Prolin-gerichtete Kinasen, die in dem Motiv S/T-P Serin- oder Threoninreste phosphorylieren (Chang *et al.* 2007, Enserink & Kolodner 2010). *S. cerevisiae* besitzt neun Zykline, die an Cdc28p binden und diese aktivieren (Andrews & Measday 1998). Jeder einzelne Zyklin-CDK-Komplex phosphoryliert bestimmte Zielproteine, die zum einen die Zellzyklusmaschinerie antreiben und zum anderen die in der jeweiligen Phase des Zellzyklus wichtigen Prozesse, wie z. B. die Knospung, steuern. Eine schematische Darstellung des Ablaufs eines Zellzyklus bei *S. cerevisiae* ist in Abbildung 1 gezeigt. Eingeleitet wird ein neuer Zellzyklus durch das einzige G1-Zyklin Cln3p. Der Übergang von G1- zur S-Phase und somit auch die Einleitung der Knospung, die Verdoppelung des Spindelpolkörpers und die Initiation der DNA-Replikation wird durch die G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p, die anschließende S-Phase durch die S-Zykline Clb5p und Clb6p reguliert. Die M-Zykline Clb1p, Clb2p, Clb3p und Clb4p sind schließlich für das Umschalten von apikalem zu isotropischem Wachstum der Knospe und für den korrekten Ablauf der Mitose verantwortlich. Die einzelnen Funktionen der Zykline zeigen dabei zum Teil große Überlappungen, sodass die Deletion einzelner Zykline mitunter keine Auswirkungen auf den Phänotyp hat (Bloom & Cross 2007, Enserink & Kolodner 2010).

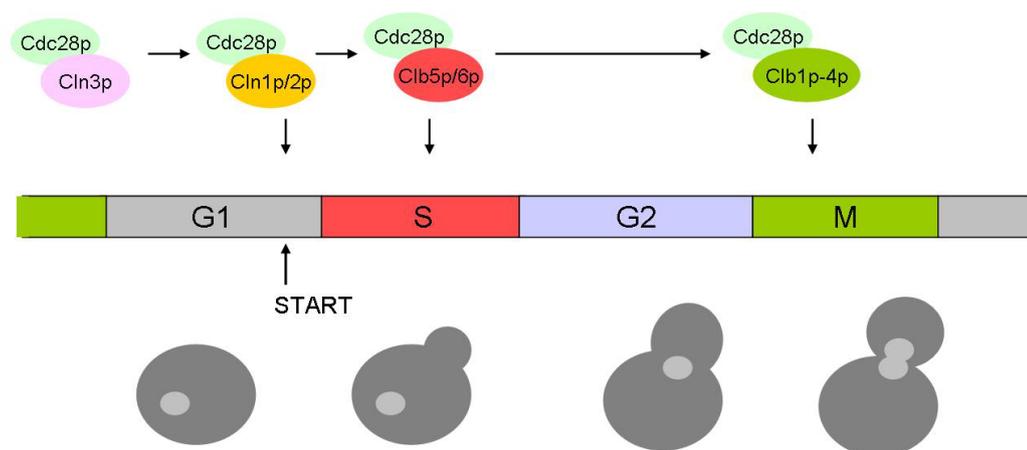


Abbildung 1: Schematischer Ablauf des Zellzyklus von *S. cerevisiae*. Der Komplex aus Cdc28p und dem G1-Zyclin Cln3p startet den Zellzyklus, indem die G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p aktiviert werden, wodurch der „Start“-Punkt überschritten wird. Die G1/S-Zykline aktivieren ihrerseits die S-Zykline Clb5p und Clb6p, die für den Durchtritt durch die S-Phase verantwortlich sind und die M-Zykline Clb1p-4p aktivieren. Diese sorgen schließlich für den korrekten Ablauf der Mitose. Phänotypisch lassen sich die Zellzyklusphasen durch die Größe der Knospe und die Lokalisation des Zellkerns, welcher vor der Mitose zum Knospenhals wandert, unterscheiden.

Verantwortlich für die wellenartige Zyklinexpression ist das akkurate Zusammenspiel zwischen Transkription und Abbau der Zykline. Die Zyclintranskription wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gesteuert, die ihrerseits ebenfalls einer strengen Regulation unterliegen. Ein Charakteristikum der Zykline ist ihre kurze Halbwertszeit, die in manchen Fällen unter 10 min beträgt (Sari *et al.* 2007) und das korrekte Fortschreiten des Zellzyklus gewährleistet. Zum schnellen proteasomalen Abbau der Zykline besitzen diese spezifische Sequenzmotive, die von zwei Ubiquitinligase-Komplexen erkannt werden. Cln1p-3p tragen jeweils ein PEST-Motiv, wodurch sie am Beginn der S-Phase durch den E3-Komplex SCF („Skp1p, Cdc53p, E-Box-Protein“) erkannt und ubiquitiniert werden (Willems *et al.* 1999). Die Ubiquitinierung der B-Typ-Zykline erfolgt am Ende der M-Phase durch den APC („Anaphase-Promoting-Complex“), der die in diesem Zyclin-Typ vorhandene „Destruction Box“ erkennt (Peters 2006). Neben den Zyklinen besitzen beide E3-Ligasen weitere Substrate, bei denen es sich u. a. ebenfalls um regulatorische Zellzyklusproteine handelt (Willems *et al.* 1999, Peters *et al.* 2002).

1.1.2 Die G1/S-Transition

Die „Entscheidung“ einer Zelle in einen neuen Zellzyklus einzutreten, wird am Ende der G1-Phase getroffen. Der genaue Mechanismus, wie dies auf molekularer Ebene geschieht, ist bislang nicht vollständig verstanden. Möglicherweise spielt dabei das Zyclin Cln3p eine entscheidende Rolle, dessen Konzentration im Gegensatz zu den anderen Zyklinen in allen

Zellzyklusphasen nahezu konstant ist (Nash *et al.* 1988, Wittenberg *et al.* 1990). Der erste Schritt zum Eintritt in einen neuen Zellzyklus ist die Aktivierung des Cln3p-Cdc28p-Komplexes, wodurch der „Start-Checkpoint“ aktiviert wird (siehe auch Abbildung 43). Dabei werden durch Cln3p-Cdc28p die für die G1/S-Transition wichtigen Transkriptionsfaktoren SBF („SCB binding factor“) und MBF („MCB binding factor“) aktiviert, indem deren Inhibitorprotein Whi5p phosphoryliert und dadurch aus dem Nukleus exportiert wird (Costanzo *et al.* 2004, de Bruin *et al.* 2004). Durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren werden über 200 zellzyklus-relevante Gene exprimiert, darunter auch die G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p durch SBF sowie die S-Zykline Clb5p und Clb6p durch MBF (Futcher 1996, Ferrezuelo *et al.* 2010). Beide Zyklintypen binden an Cdc28p, wobei die S-Zykline zunächst durch das Inhibitorprotein Sic1p in einem inaktiven Zustand gehalten werden. Die aktiven Cln-Cdc28p-Komplexe initiieren nun u. a. die Bildung der Knospe, die Verdoppelung des SPB („Spindle Pole Body“) sowie die Phosphorylierung von Sic1p. Diese Modifikation stellt eine Markierung zur Ubiquitinierung dar, sodass phosphoryliertes Sic1p durch den SCF-Komplex ubiquitiniert und dadurch proteasomal abgebaut wird. Durch den Sic1p-Abbau werden die Clb5p- und Clb6p-Cdc28p-Komplexe zeitverzögert zu den G1/S-Zyklinen aktiviert und steuern durch Initiierung der DNA-Replikation den Durchtritt durch die S-Phase (Schwob *et al.* 1994, Bloom & Cross 2007).

1.1.3 Der „anaphase-promoting-complex“ APC

Bei dem „anaphase-promoting-complex“ (APC) handelt es sich um einen aus 13 Untereinheiten bestehenden, 1,7 MDa großen Multiproteinkomplex, der als Ubiquitinligase das Fortschreiten des Zellzyklus durch die M-Phase reguliert (Passmore *et al.* 2005, Barford 2011). Die Hauptaufgaben des APC liegen zum einen in der Initiation der Anaphase und zum anderen in der Zyklininaktivierung. Aktiviert wird der APC zu Beginn der M-Phase durch Cdc28p-abhängige Phosphorylierung sowie durch die Interaktion mit dem Aktivatorprotein Cdc20p (Rudner & Murray 2000). Der APC^{Cdc20p}-Komplex initiiert zu Beginn der Anaphase die Trennung der Schwesterchromatiden, indem das an Separase gebundene Protein Securin ubiquitiniert und abgebaut wird. Die dadurch aktivierte Separase spaltet ihrerseits nun das Protein Cohesin, welches die Schwesterchromatiden zusammenhält. Durch die Cohesin-Proteolyse können die Schwesterchromatiden durch den Spindelapparat getrennt werden (Nasymth 2001). Neben dem Abbau von Securin initiiert der APC^{Cdc20p}-Komplex ebenso den Abbau der B-Typ-Zykline. Dieser Schritt ist zum Fortschreiten des Zellzyklus essentiell, da die Mitose nur abgeschlossen werden kann, wenn Cdc28p vollständig inaktiv ist (Irniger 2002, Wäsch & Cross 2002). Im Verlauf der Anaphase startet eine komplexe Signalkaskade, die als „mitotic exit network“ (MEN) bezeichnet wird und den Austritt der

Zellen aus der Mitose einleitet (Bardin & Amon 2001). Essentieller Bestandteil ist dabei die Phosphatase Cdc14p, die u. a. die Proteine Cdh1p, Sic1p und Swi5p dephosphoryliert (Visintin *et al.* 1998, Peters 2002). Durch die Dephosphorylierung der genannten Proteine wird durch mehrere Mechanismen sichergestellt, dass die Cdc28p-Aktivität am Ende der M-Phase abnimmt. Sic1p hemmt in dephosphoryliertem Zustand die S-Zykline und wird zusätzlich durch den nun ebenfalls dephosphorylierten Transkriptionsfaktor Swi5p in erhöhtem Maße exprimiert. Cdh1p ist ebenfalls ein Aktivator des APC, der durch Dephosphorylierung gegen Cdc20p ausgetauscht wird. Der APC^{Cdh1p}-Komplex vollendet den Abbau der B-Typ-Zykline, wodurch Cdc28p vollständig inaktiviert wird (Peters 2002). Alle genannten Mechanismen zur Cdc28p-Inaktivierung stellen sicher, dass die Zelle nicht aus der Mitose austreten kann, bevor die Schwesterchromatiden voneinander getrennt sind. Der APC^{Cdh1p}-Komplex ist während der kompletten G1-Phase aktiv und wird erst durch Cdh1p-Phosphorylierung am Ende der G1-Phase inaktiviert, sodass auch während der G1-Phase keine CDK-Aktivität in der Zelle vorliegt (Peters 2006). Im Hinblick auf die DNA-Replikation in der S-Phase spielt der APC ebenso eine essentielle Rolle, da die in der G1-Phase stattfindende Assemblierung der prä-Replikationskomplexe nur vonstatten geht, wenn Cdc28p inaktiv ist (Noton & Diffley 2000).

1.1.4 Transkriptionelle Regulation des Zellzyklus am G1/S-Übergang

Die Regulation des Zellzyklus eukaryotischer Zellen erfolgt auf unterschiedlichen Ebenen, die viele zelluläre Mechanismen und Prozesse einschließt. Die Aktivität der Zyklin-CDK-Komplexe wird dabei neben dem Zyklinabbau, der Zyklinlokalisierung, dem Wirken inhibitorischer („CDK inhibitory proteins“, CKIs) oder aktivierender („CDK activating kinases“, CAKs) Proteine vor allem auf transkriptioneller Ebene reguliert.

Dabei spielt die transkriptionelle Regulation insbesondere am Übergang von der G1- zur S-Phase eine entscheidende Rolle, da an diesem Punkt ein neuer Zellzyklus gestartet wird (Koch *et al.* 1999). Die ersten und somit wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die am Ende der G1-Phase aktiviert werden und den „Start“-Übergang einleiten, sind die in Punkt 1.1.2 beschriebenden Faktoren SBF und MBF, die die G1/S- bzw. S-Zyklinexpression einleiten. Daneben sind bisher 14 weitere Zellzyklus-relevante Transkriptionsfaktoren in *S. cerevisiae* bekannt (Wu & Li 2008), die insgesamt die Expression von über 800 zellzykluspezifischen Genen regulieren, was etwa 14 % des Hefegenoms entspricht (White *et al.* 2009). Neben den Transkriptionsfaktoren selbst sind auch Komponenten der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie, bestehend aus der RNA-Polymerase II (RNAPII), den generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH, sowie dem Srb/Med-Komplex („Mediator“), an der zellzyklusabhängigen Expression beteiligt. Dabei spielt der

Faktor TFIID eine besondere Rolle, da dieser direkt und sequenzspezifisch an die Promotorsequenz bindet. Er setzt sich aus dem „TATA-box binding protein“ (TBP) und mehreren „TBP assoziierten Faktoren“ (TAFs) zusammen. Insgesamt sind 14 TAFs in *S. cerevisiae* bekannt (Shen *et al.* 2003), von denen Taf1p (TAF_{II}145) essentiell zur Transkription der G1/S- und S-Zykline ist (Walker *et al.* 1997). Mutationen in Taf1p führen dazu, dass die Expression der SBF- und MBF-regulierten Gene zum Erliegen kommt, was in einem G1/S-Arrest resultiert (Holstege *et al.* 1998, Koch *et al.* 1999, Green 2000). Ein weiterer Komplex der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie, der ebenfalls in diesem „Pathway“ eine Rolle spielt, ist der Paf1-Komplex (Porter *et al.* 2002). Dieser aus fünf Untereinheiten bestehende Komplex ist an vielen Transkriptions-regulierenden Prozessen, wie z. B. Elongation, Histon-modifikation und Rekrutierung von 3'-prozessierenden Faktoren beteiligt (Jaehning 2010). Ebenso ist der Komplex an der korrekten Expression der G1/S-Zykline beteiligt, da eine Deletion der Untereinheiten Paf1p oder Ctr9p eine Reduktion dieser Zykline zur Folge hat (Koch *et al.* 1999).

Neben den aufgeführten Beispielen wird der Zellzyklus von *S. cerevisiae* durch eine Vielzahl weiterer Mechanismen reguliert, die den korrekten Ablauf des Zellzyklus sicherstellen. Bei Störungen des Regulationsapparates kommt es zum Arrest an bestimmten Punkten innerhalb des Zellzyklus. Bei ungünstigen Umweltbedingungen kann eine Zelle aktiv einen Arrest an bestimmten „Checkpoints“ einleiten. Ebenso können externe Faktoren einen Arrest des Zellzyklus in bestimmten Phasen induzieren. Dazu zählen z. B. bestimmte Toxine, darunter auch das in der vorliegenden Arbeit untersuchte virale Killertoxin K28 der Hefe *S. cerevisiae*.

1.2 Der Transport von Proteinen in und aus dem Nukleus

1.2.1 Der Kernporenkomplex

Eukaryotische Zellen besitzen eine intrazelluläre Kompartimentierung in Organellen, die es ihnen ermöglicht, verschiedenste zelluläre Reaktionen gleichzeitig ablaufen zu lassen. Der Zellkern stellt dabei das Organell dar, das die genetische Information in Form von Chromatin beherbergt. Zur Translation der genetischen Information ist es notwendig, dass die mRNA aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert wird, wo die Proteinbiosynthese hauptsächlich stattfindet. Von gleicher Wichtigkeit sind u. a. der Export ribosomaler RNA aus dem Zellkern, sowie der Kernimport zahlreicher Proteine, die z. B. an Transkription, Replikation oder Zellzyklusregulation beteiligt sind. Begrenzt wird der Nukleus durch die Kernhülle („nuclear

envelope“, NE), eine Doppelmembran, die kontinuierlich in das Membransystem des ER übergeht. Der Transport von Molekülen aus oder in den Nukleus wird durch die Kernporenkomplexe („nuclear pore complex“, NPC) gewährleistet, die einen wässrigen Transportkanal, die Kernpore, bilden. Je nach Zellzyklusphase enthält ein Zellkern von *S. cerevisiae* 65 bis 182 NPCs (Winey *et al.* 1997). Mit einem Molekulargewicht von 66 MDa bei *S. cerevisiae* (Rout & Blobel 1993) und 122 MDa bei *Xenopus laevis* (Reichelt *et al.* 1990) stellen die NPCs die größten Multiproteinkomplexe dar, die in eukaryotischen Zellen bekannt sind. Seit der Entdeckung der NPCs in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wird intensiv an der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur auf atomarer Ebene gearbeitet, was sich aufgrund der enormen Größe und Dynamik als äußerst schwierig erweist. Der schematische Aufbau der NPCs, gezeigt in Abbildung 2, ist dennoch bekannt. Eingelagert in der Kernhülle ist ein „Donut“-förmiger Zentralkörper, der eine oktagonale Symmetrie besitzt und einen zylindrischen Kanal, die Kernpore, bildet. Auf zytosolischer Seite findet sich daran angelagert der zytoplasmatische Ring mit acht ins Zytoplasma ragenden Filamenten. Im Kernlumen ist an den Zentralkörper der nukleoplasmatische Ring befestigt, von dem aus eine korbartige Struktur („nuclear basket“) in das Nukleoplasma ragt. Nukleoplasmatischer und zytoplasmatischer Ring sind durch die Kernmembran über mehrere speichenartige Strukturen verbunden (Wente & Rout 2010, Hoelz *et al.* 2011). Neben dem nukleozytoplasmatischen Transport ist der NPC an zahlreichen weiteren zellulären Funktionen, wie z.B. der Chromatinorganisation, DNA-Reparatur, mRNA-Prozessierung und Regulation der Genexpression, beteiligt (Galy *et al.* 2000, Khadaroo *et al.* 2009, Strambio-de-Castilla *et al.* 2010, Tous *et al.* 2011).

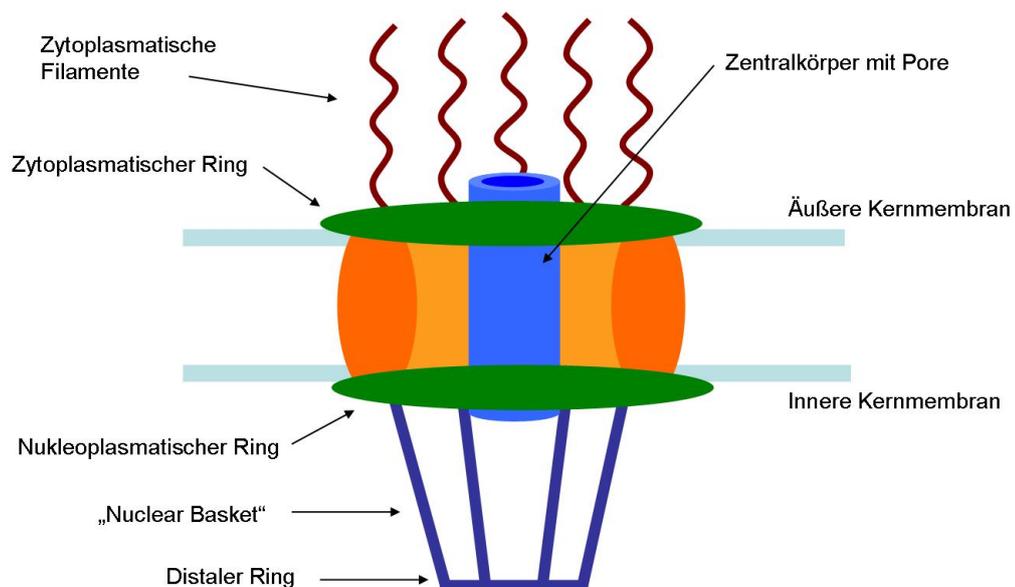


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Kernporenkomplexes.

Die Proteine, aus denen der Kernporenkomplex zusammengesetzt ist, werden als Nukleoporine (NUPs) bezeichnet, von denen insgesamt etwa 30 verschiedene bekannt sind (Rout *et al.* 2000). Die genaue Stöchiometrie der einzelnen NUPs in einem NPC ist nicht bekannt, allerdings ist jedes NUP in multiplen Kopien in einem NPC zu finden, so dass schätzungsweise ein Kernporenkomplex aus etwa 500 bis 1000 Nukleoporinen zusammengesetzt ist (Hoelz *et al.* 2011).

1.2.2 Der nukleozytoplasmatische Transport

Der Kanal zum bidirektionalen Transport von Molekülen aus oder in den Nukleus wird von den NPCs gebildet und besitzt einen Durchmesser von etwa 90 bis 100 Å, wodurch die freie Diffusion von Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von etwa 40 bis 50 kDa gewährleistet wird. Größere Proteine können nur mit Hilfe von Transportproteinen durch die Kernpore geleitet werden. Durch die Dynamik der NPCs ist ein Transport von Cargo-Molekülen mit einem Durchmesser von bis zu 390 Å möglich (Paine *et al.* 1975, Keminer & Peters 1999, Pante & Kann 2002). Verschiedene Nukleoporine besitzen Bereiche mit 20 bis 30 FG-Wiederholungen, die in das Lumen der Kernpore hineinragen und dadurch eine Diffusionsbarriere bilden. Schätzungen zufolge enthält ein NPC bis zu 3500 FG-Wiederholungen (Strawn *et al.* 2004, Stewart 2007). Die genaue Regulierung der Kernporen-Permeabilität ist nicht vollständig verstanden und wird zurzeit intensiv diskutiert (Stewart 2007). Neben der Funktion als Diffusionsbarriere stellen die FG-Bereiche die Andockstellen für Kerntransportproteine dar (Bayliss *et al.* 1999, Hoelz *et al.* 2011).

Der gerichtete Transport von Molekülen aus oder in den Nukleus wird durch spezielle Transportproteine, den β -Karyopherinen gewährleistet, von denen die Importine für den Transport von Proteinen in den Zellkern und die Exportine für den Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma verantwortlich sind. Bei *S. cerevisiae* sind 14 Karyopherine, darunter zehn Importine, drei Exportine und ein bidirektionales Transportprotein bekannt (Fried & Kutay 2003, Cook *et al.* 2007, Stewart 2007).

Für den Proteinimport in den Nukleus sind verschiedene Transportmechanismen bekannt, von denen der Importin- β -abhängige Transport am besten untersucht ist. Voraussetzung für den Kernimport über diesen Weg ist das Vorhandensein eines Kernlokalisierungssignals („nuclear localization signal“, NLS) in dem zu importierenden „Cargo“-Protein. Die klassischen NLS-Sequenzen (cNLS) lassen sich in zwei Klassen einteilen. Monopartite NLS-Sequenzen, wie sie z. B. bei dem großen T-Antigen des SV40-Virus zu finden sind, bestehen aus einem „Cluster“ aus vier bis fünf basischen Aminosäuren, wohingegen bipartite NLS-Sequenzen ein weiteres basisches „Cluster“ aus zehn bis zwölf Aminosäuren stromabwärts des ersten „Clusters“ besitzen (Stewart 2007, Hahn *et al.* 2008). Der klassische Importzyklus

solcher cNLS-tragenden Proteine lässt sich in vier Schritte einteilen. Im Zytoplasma bindet Importin- β , meist in Verbindung mit dem Adapterprotein Importin- α , die NLS-Sequenz eines „Cargo“-Proteins. Dieser Komplex bindet an die FG-Wiederholungen eines NPCs und wird auf noch unbekannte Weise durch die Kernpore transportiert. Im Nukleus bindet RanGTP („ras-related nuclear protein“) an Importin- β , wodurch der Importkomplex dissoziiert und das „Cargo“-Protein in das Nukleoplasma entlassen wird. Sowohl Importin- α als auch der Importin- β -RanGTP-Komplex werden mit Hilfe von Exportinen zurück in das Zytosol transportiert, wo durch RanGAP („GTPase activating protein“) die intrinsische GTPase-Aktivität von Ran aktiviert wird. Der Exportkomplex dissoziiert, Importin- β löst sich von RanGDP und steht für einen neuen Importzyklus zur Verfügung. Zum Recycling von RanGTP wird RanGDP zurück in den Kern transportiert und GDP gegen GTP durch RanGEF („guanine nucleotide exchange factor“) ausgetauscht (Sorokin *et al.* 2007, Stewart 2007). Auf diesem Weg werden etwa 100 bis 1000 „Cargo“-Proteine pro Minute pro NPC in den Nukleus importiert (Ribbeck & Görlich 2001).

Zum Export von Proteinen aus dem Nukleus benötigen diese ein hydrophobes, Leucinreiches Kernexportsignal („nuclear export signal“, NES), wie es z. B. bei den Importinen zu finden ist (Macara 2001, Sorokin *et al.* 2007). Exportine, die im Nukleus mit RanGTP assoziiert sind, binden NES-Sequenzen und transportieren das „Cargo“-Protein zurück in das Zytoplasma. Durch die oben beschriebene Umwandlung von RanGTP in RanGDP dissoziiert der Transportkomplex und das Exportin kann zurück in den Zellkern importiert werden (Moroianu 1999).

Die Bereitstellung der Energie für den Kernimport und -export erfolgt in beiden Fällen durch Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP im Zytosol. Dadurch, dass RanGAP zytosolisch und RanGEF nukleär lokalisiert sind, besteht zwischen Kern und Zytoplasma ein RanGTP-Konzentrationsgradient (Stewart 2007), der die korrekte Richtung von Import und Export gewährleistet.

1.3 Das virale Killertoxin K28

1.3.1 Allgemeine Aspekte

Das Killerphänomen in *S. cerevisiae* wurde erstmals von Bevan und Makover Anfang der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieben. Sie entdeckten *S. cerevisiae* Stämme, die in der Lage waren durch Sekretion eines „Killerfaktors“ sensitive Hefen der gleichen oder einer anderen Spezies ohne direkten Zell-Zell-Kontakt abzutöten (Bevan & Makover 1963, Woods & Bevan 1968, Magliani *et al.* 1997). Eine erste Klassifizierung von Killerhefen

erfolgte im Jahr 1978 und basierte auf der Beobachtung, dass Killerstämme jeweils gegen das eigene Toxin immun, jedoch sensitiv gegen Toxine anderer Stämme sind (Young & Yagiu 1978). Der Killerphänotyp bei Hefen ist weit verbreitet und konnte in zahlreichen Hefegattungen, wie z. B. *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Ustilago*, *Torulopsis* und *Hansenula* nachgewiesen werden (Yokomori *et al.* 1988, Gunge *et al.* 1981, Hayman & Bolen 1991, Park *et al.* 1994, Hodgson *et al.* 1994, Schmitt *et al.* 1997, Bussey & Skipper 1975, Koltin & Day 1975, Radler *et al.* 1993, Yamamoto *et al.* 1986). In den natürlichen Wachstumsbedingungen von Hefen, wie z. B. die Oberfläche faulender Früchte, bietet die Ausprägung des Killerphänotyps einen entscheidenden Selektionsvorteil, da das Wachstum von um Nährstoffe konkurrierenden Hefen inhibiert wird. So ist die toxinproduzierende Hefe *Pichia kluyveri* dazu in der Lage, in einer Mischkultur die sensitive Hefe *Cryptococcus cereanus* in ihrem Wachstum zu inhibieren (Starmer *et al.* 1987).

In der industriellen Produktion von Bier und Wein besitzen Killerhefen einen hohen Stellenwert. Sie werden als Starterkulturen bei Fermentationsprozessen eingesetzt, um eine Kontamination mit unerwünschten Hefen und anderen Pilzen zu vermeiden, wodurch die Produktqualität gesteigert werden kann (Boone *et al.* 1990, Petering *et al.* 1991, Vagnoli *et al.* 1993, Magliani *et al.* 1997, Pérez *et al.* 2001). Ebenso wurde der Einsatz von Killertoxinen als natürliche Nahrungskonservierungsmittel beschrieben (Lowes *et al.* 2000). Eine Verwendung von Killerhefen in der grünen Biotechnologie ist ebenfalls möglich. Maispflanzen, die das Killertoxin KP4 der Hefe *Ustilago maydis* exprimieren, zeigen eine Resistenz gegenüber phytopathogenen Hefen (Allen *et al.* 2011). Die transgene Expression dieses Toxins verleiht Tabakpflanzen ebenfalls diesen Schutzmechanismus (Kinal *et al.* 1995, Park *et al.* 1996). Eine medizinische Anwendung von Killertoxinen zur Behandlung von Mykosen ist ebenfalls vielversprechend (Seguy *et al.* 1998, Magliani *et al.* 2001) und bietet deutliche Vorteile im Vergleich zu klassischen Antimykotika. Da viele Killertoxine zunächst an die Hefezellwand binden müssen, um zur Plasmamembran oder ins Zellinnere zu gelangen, wirken sie sehr spezifisch nur gegen Hefe- und andere Pilzzellen, wodurch eine nahezu nebenwirkungsfreie Therapie vor allem gegen oberflächliche Mykosen möglich ist (Polonelli 1986, Selitrennikoff 2001, Schmitt & Breinig 2002). Ein großes Interesse stellen dabei Killertoxine dar, die auch gegen humanpathogene Hefen, wie *Candida albicans* oder *Pneumocystis carinii* eine toxische Wirkung zeigen (Seguy *et al.* 1998, Magliani *et al.* 2001). Aus biotechnologischer Sicht sind Killerhefen ebenfalls sehr interessant. Durch die Verwendung toxineigener Sekretions- und Prozessierungssequenzen kann die Effizienz der Sekretion heterologer Proteine in *S. cerevisiae* erheblich gesteigert werden (Heintel *et al.* 2001, Schmitt & Breinig 2002). Darüber hinaus hat die Erforschung der molekularbiologischen Grundlagen des Killerphänotyps nicht nur Erkenntnisse über

Hefeviren, Toxinsekretion und -wirkung geliefert, sondern auch das Verständnis vieler essentieller zellulärer Prozesse bei Eukaryonten, wie z. B. die Zellwandsynthese von Hefen, die Pro-Proteinprozessierung und den retrograden Proteintransport, erweitert.

1.3.2 Genetische Grundlagen des Killerphänotyps

Die genetische Basis des Killerphänotyps ist zwischen den Hefegattungen sehr variabel. Es sind drei Möglichkeiten der genetischen Kodierung von Killertoxinen bekannt. Im Falle von *Williopsis mrakii* oder *Pichia kluyveri* ist die Information zur Killertoxinexpression chromosomal kodiert, bei *Kluyveromyces lactis* oder *Pichia acaciae* finden sich lineare dsDNA-Plasmide (Hodgson *et al.* 1995, Young & Yagiu, 1978, Gunge *et al.* 1981, Hayman & Bolen 1991). Der Killerphänotyp aller bei *S. cerevisiae* bisher bekannten Toxine beruht auf zytosolisch persistierenden dsRNA-Viren (Bostian *et al.* 1984, Schmitt & Tipper 1990, Dignard *et al.* 1991, Rodríguez-Cousino *et al.* 2011).

Innerhalb der Mykoviren gehören die toxinkodierenden dsRNA-Viren der *Totiviridae* Familie an und liegen als „virus like particles“ (VLPs) im Zytoplasma der Hefezellen vor. Eine infektiöse Form dieser 40 nm großen, ikosaedrischen Partikel scheint natürlicherweise nicht vorzukommen, weshalb die Weitergabe der VLPs ausschließlich vertikal bei der Zellteilung erfolgt (Wickner 1989, Chen *et al.* 1994). Zur Ausprägung des Killerphänotyps ist das Vorhandensein von zwei verschiedenen dsRNA-Viren nötig: das M-Killervirus („Medium“) kodiert ausschließlich für das Killertoxin und ist abhängig von dem L-A-Helfervirus („Large“), das die nötige Replikationsmaschinerie sowie das Capsidprotein bereitstellt. Das Genom des kryptischen L-A-Virus hat eine Größe von 4,6 kb und kodiert auf dem (+)-Strang für zwei sich um 130 Nukleotide überlappende „open reading frames“ (ORF): das Kapsidprotein Gag (76 kDa) und eine RNA-abhängige RNA-Polymerase. Letztere wird stets als Gag-Pol-Fusionsprotein (171 kDa) durch einen -1 ribosomalen Leserasterwechsel hergestellt. Beim Replikationszyklus von L-A werden einzelne (+)-ssRNA-Moleküle durch Gag-Pol *in viro* transkribiert und durch Poren in der Kapsidhülle aus dem VLP in das Zytoplasma entlassen. Dort dient dieser Strang zum einen als mRNA-„Template“ zur Produktion von Gag und Gag-Pol, zum anderen erfolgt durch in der 3'-Region vorhandene Verpackungssignale („viral binding sites“) die Initiation des Kapsidzusammenbaus. Dabei wird ein (+)-ssRNA-Strang von 120 Gag-Monomeren und zwei Gag-Pol-Fusionen matrizunabhängig („self assembly“) zu einem VLP verpackt. Nach Abschluss des Zusammenbaus erfolgt die Replikation des Virusgenoms, indem die RNA-abhängige RNA-Polymerase *in viro* den Minusstrang synthetisiert (Icho & Wickner 1989, Ribas *et al.* 1994, Wickner 1996, Caston *et al.* 1997, Schmitt & Breinig 2002).

Die toxinkodierenden M-Viren parasitieren den Replikationszyklus von L-A und nutzen die von L-A synthetisierten Proteine Gag und Gag-Pol zur Replikation des (-)-Stranges, zur Transkription des (+)-Stranges und zum Kapsidzusammenbau. Im Gegensatz zu L-A-Virionen, können M-Virionen aufgrund der geringen Genomgröße bis zu zwei Kopien ihrer M-dsRNA verpacken, ein Mechanismus, der als „headful packaging“ bezeichnet wird (Esteban & Wickner 1986, Wickner 1996). Die M-Virionen der verschiedenen Killerviren von *S. cerevisiae* schließen sich durch einen noch unbekanntem Mechanismus auf replikativer Ebene aus, wodurch natürlicherweise eine infizierte Hefezelle immer nur ein Killertoxin exprimieren kann. Durch Plasmid-getriebene Koexpression viraler cDNA-Kopien ist es dennoch möglich, einen *S. cerevisiae* Stamm zu generieren, der verschiedene Killertoxine gleichzeitig sezerniert (Schmitt & Tipper 1992, Schmitt & Schernikau 1997). Die auch als Satellitenviren bezeichneten Killerviren M1, M2, M28 und *Mlus* besitzen eine Genomgröße von 1,6 bis 2,3 kb und enthalten nur jeweils den für das entsprechende Killertoxin kodierenden ORF. Diese werden als Präprotoxine synthetisiert, welche die Bezeichnungen K1, K2, K28 und *Klus* tragen.

Allgemein unterscheiden sich Killertoxine erheblich in ihren Wirkungsmechanismen. Bei vielen manifestiert sich ihre Wirkung auf Ebene der Plasmamembran, wo sie als Ionophor die Ausbildung von Poren induzieren, wodurch es zu einem Ausstrom von Ionen, ATP und weiterer niedermolekularer Zellbestandteile kommt und somit letztendlich der Zelltod eingeleitet wird. Gezeigt werden konnte dies an K1 und dem aus *Zygosaccharomyces bailii* stammenden Killertoxin Zygocin (Bussey 1991, Weiler *et al.* 2002). Einen ähnlichen Mechanismus scheint auch K2 zu nutzen (Novotná *et al.* 2004). Die Wirkungsweise des erst kürzlich entdeckten *Klus* aus *S. cerevisiae* ist bisher noch nicht bekannt (Rodríguez-Cousino *et al.* 2011). Das in dieser Arbeit untersuchte Killertoxin K28 nimmt unter den bei *S. cerevisiae* vorkommenden Hefetoxinen eine besondere Stellung ein, da der Abtötungsmechanismus nicht in einer ionophoren Wirkung auf Ebene der Plasmamembran, sondern in einem Zellzyklusarrest begründet liegt (Pfeiffer & Radler 1982, Schmitt *et al.* 1996). Zymocin aus *K. lactis* und PaT aus *Pichia acaciae* sind ebenfalls Zellzyklus-arretierende Killertoxine, deren Wirkmechanismen sehr gut untersucht sind. Bei beiden Toxinen handelt es sich um Nukleasen, die spezifisch in der Anticodonsequenz spezifischer tRNAs schneiden, was zum Arrest des Zellzyklus in der späten G1-Phase im Falle von Zymocin und in der frühen S-Phase bei PaT führt (Lu *et al.* 2005, Klassen *et al.* 2008, Studte *et al.* 2008).

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass das Killertoxin PMKT2 aus *Pichia membranifaciens* einen ähnlichen Effekt auf sensitive Hefezellen besitzt wie K28. Es wurde gezeigt, dass mit PMKT2 behandelte Hefezellen ihren Zellzyklus in der frühen S-Phase arretieren und eine

unreife Knospe ausbilden. Ähnlich wie K28 induziert eine nicht letale Dosis von PMKT2 Apoptose in den Zielzellen (Santos *et al.* 2009, Santos *et al.* 2012).

1.3.3 Prozessierung und Sekretion

Im Hinblick auf Proteinprozessierung und Sekretion stellen K1 und K28 die am besten untersuchten Killertoxine dar. Interessanterweise verläuft deren Prozessierung sehr ähnlich zur Prozessierung des präpro- α -Faktors der Hefe *S. cerevisiae* und der Proinsulin-Reifung in höheren Eukaryonten (Dmochowska *et al.* 1987, Steiner *et al.* 1992, Riffer *et al.* 2002).

Das 1990 von Schmitt und Tipper erstmals isolierte 1,8 kb große dsRNA-Genom des ScV-M28 Virus kodiert in infizierten Hefezellen ein 345 AS großes Präprotoxin (pptox) mit einem Molekulargewicht von 38 kDa (Schmitt & Tipper 1990, Breinig *et al.* 2006). Der unprozessierte Toxinvorläufer setzt sich aus fünf Untereinheiten zusammen. Am N-Terminus befindet sich eine hydrophobe ER-Signalsequenz (prä), die den posttranslationalen Import des Vorläufers in das ER-Lumen gewährleistet, gefolgt von einer Pro-Region (δ , pro), deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. An die Pro-Region schließt sich die toxische, 10,5 kDa große α -Untereinheit (K28 α), eine potentiell glykosylierte γ -Untereinheit und die für die Bindung an die Zielzelle wichtige, 11 kDa große β -Untereinheit (K28 β) an. Das unprozessierte Vorläufertoxin wird über den Sec61-Komplex post-translational in das ER-Lumen importiert, wo die Prä-Sequenz durch den Signalpeptidase-komplex entfernt wird. Die luminalen ER-Chaperone Kar2p (BiP) und Cne1p (Calnexin) vermitteln die Faltung des Protoxins. Ebenso wird die γ -Sequenz N-glykosyliert sowie α - und β -Untereinheit durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Letzterer Schritt wird durch die Proteindisulfid-isomerase Pdi1p katalysiert. Die weiteren Prozessierungsschritte erfolgen im späten Golgi-Apparat durch die Furin-ähnliche Endopeptidase Kex2p und die Carboxypeptidase Kex1p. Kex2p entfernt zunächst die Pro-Region und die intramolekulare γ -Sequenz. Die C-Termini der α - und β -Untereinheit werden durch Kex1p-vermittelte Abspaltung der endständigen Argininreste getrimmt. Dieser zur Toxinsekretion essentielle Schritt demaskiert das am C-Terminus der β -Untereinheit befindliche ER-Retentionssignal HDEL und ermöglicht so die spätere Bindung des reifen Toxins an den HDEL-Rezeptor Erd2p sensitiver Hefezellen (Gießelmann 2011). Dieses Motiv findet sich gewöhnlich in luminalen ER-Proteinen und ermöglicht deren Rückführung aus späten Kompartimenten des Sekretionsweges. Durch die Maskierung des Signals im frühen Sekretionsweg wird eine Akkumulation des Toxins im ER verhindert. Das reife, heterodimere Toxin wird in Vesikel verpackt und exozytotisch in die Umgebung sezerniert (Schmitt & Tipper 1995, Eisfeld *et al.* 2000, Riffer *et al.* 2002, Schmitt & Breinig 2006). Ein schematischer Aufbau des Toxinvorläufers sowie der Prozessierung zum reifen Toxin sind in Abbildung 3 gezeigt.

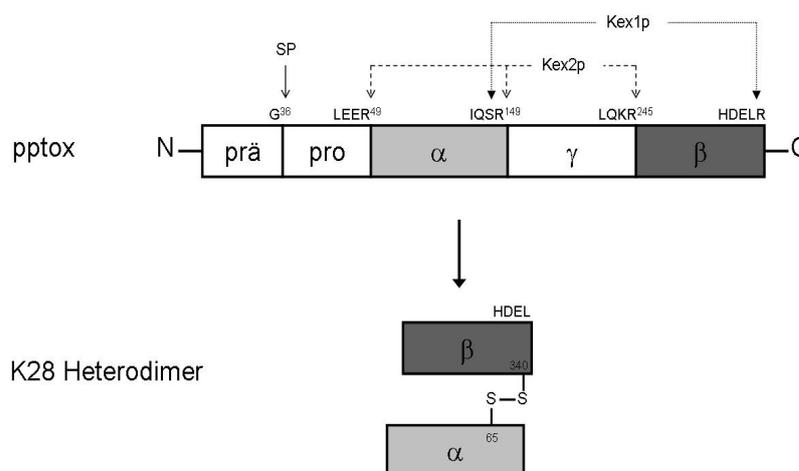


Abbildung 3: K28-pptox und dessen Prozessierung zum reifen Heterodimer. Das Präprotoxin wird posttranslational in das ER importiert, wo die ER-Signalsequenz (prä) durch die Signalpeptidase (SP) abgespalten wird. Im ER wird zwischen K28 α und K28 β eine Disulfidbrücke gebildet und die γ -Sequenz glykosyliert. Im Golgi-Apparat erfolgt zunächst eine proteolytische Entfernung der pro- und γ -Domäne durch die Endopeptidase Kex2p. Vor Sekretion des reifen K28-Heterodimers wird durch die Carboxypeptidase Kex1p der jeweils C-terminale Argininrest an der α - und β -Untereinheit entfernt (nach Riffer *et al.* 2002, Schmitt & Breinig 2006)

Im Hinblick auf den strukturellen Aufbau des reifen Toxins und die Funktion der einzelnen Untereinheiten lassen sich starke Ähnlichkeiten zwischen K28 und Vertretern der großen Gruppe der A/B-Toxine erkennen. Diese meist bakteriellen oder pflanzlichen Toxine bestehen grundsätzlich aus einer toxizitätsvermittelnden A-Untereinheit und einer oder mehreren B-Untereinheiten, die für die Bindung an die Zielzelle und den intrazellulären Transport verantwortlich sind. Zu den typischen Vertretern der A/B-Toxine zählen beispielsweise das Diphtherie-, Anthrax-, Shiga- oder Cholera-Toxin sowie die pflanzlichen Proteintoxine Ricin und Abrin (Falnes & Sandvig, 2000).

1.3.4 K28-Aufnahme und retrograder Transport

Trotz der unterschiedlichen Wirkmechanismen von K1, K2 und K28 verläuft die initiale Toxinbindung bis auf die Ebene der Plasmamembran bei allen Killertoxinen gleich. Es handelt sich um einen zweistufigen Mechanismus, der durch energieunabhängige Bindung der Toxine an einen Primärrezeptor in der Hefezellwand eingeleitet wird. Im Falle von K1 und K2 handelt es sich dabei um ein β -1,6-D-Glukan; K28 bindet an ein α -1,3-Mannoprotein. Durch die Bindung an die Zellwand werden die Toxine zunächst innerhalb der Zellwand konzentriert, wodurch eine Interaktion mit dem Sekundärrezeptor gefördert wird (Hutchins & Bussey 1983, Schmitt & Radler 1987, Schmitt & Radler 1988). Die energieabhängige

Translokation vom Primär- zum Sekundärrezeptor stellt den zweiten Schritt im Aufnahmemechanismus dar. Für alle genannten Killertoxine findet sich der Sekundärrezeptor in der Plasmamembran und konnte mit Kre1p für K1 eindeutig identifiziert werden (Breinig *et al.* 2002). Für K28 verdichten sich die Hinweise darauf, dass auf Ebene der Plasmamembran eine Interaktion mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p stattfindet. Dieser befindet sich natürlicherweise im Sekretionsweg und ist für die Rückführung ER-residenter Proteine aus dem Golgi-Apparat verantwortlich. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass sich geringe Kopien von Erd2p ebenfalls in der Plasmamembran befinden (Dausend 2010). K28 bindet mit seinem β -C-terminalen HDEL-Motiv an den Erd2p-Rezeptor und wird mit diesem als Rezeptor-Liganden-Komplex über Endozytose in die Zelle aufgenommen. Das Toxin „tarnt“ sich somit als ER-residentes Protein und wird durch den natürlichen ER-Retentionsmechanismus retrograd im Sekretionsweg bis in das ER transportiert. Zellen, die Mutationen in wichtigen Komponenten der Endozytose- oder ER-Retentionsmaschinerie tragen ($\Delta end3$, $\Delta erd2$), zeigen eine Resistenz gegenüber K28 (Eisfeld *et al.* 2000, Eisfeld 2001). Im ER trennt sich aufgrund des neutralen pH-Wertes K28 von Erd2p und wird über einen noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus in das Zytosol retrotransloziert. Im Zytosol wird die Disulfidbrücke zwischen α - und β -Untereinheit von K28 gespalten. K28 β wird ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, wohingegen K28 α seine toxische Wirkung entfalten kann und einen Zellzyklusarrest sowie eine Hemmung der DNA-Synthese induziert (Schmitt *et al.* 1996, Heiligenstein *et al.* 2006).

1.3.5 Immunität

Neben sensitiven Hefezellen, die durch Aufnahme von K28 abgetötet werden, kann das Toxin ebenso von K28-produzierenden Zellen wieder aufgenommen werden. Die Toxin-produzierenden Zellen haben daher einen Mechanismus entwickelt, der ihnen eine Immunität gegen ihr eigenes Toxin verleiht (Breinig *et al.* 2006). Es konnte gezeigt werden, dass K28-produzierende Zellen das Toxin ebenfalls internalisieren und bis in das Zytosol transportieren, wo sich die Immunität manifestiert. Dort kommt es zu einer Interaktion zwischen reinternalisiertem Toxin und dem Toxinvorläufer pptox. Ein solcher Komplex konnte eindeutig identifiziert werden. Das auf diese Weise abgefangene Toxin wird im Komplex mit pptox ubiquitiniert und proteasomal degradiert, wodurch die Zelle vor der toxischen Wirkung der α -Untereinheit geschützt ist. Eine Komplexbildung aus pptox und reifem K28-Toxin wird auf Zytosolebene durch den posttranslationalen ER-Import des Toxinvorläufers ermöglicht. Ein Austausch der ER-Signalsequenz gegen das kotranslationale ER-Targetingsignal von K1 vermindert den Schutz Toxin-produzierender Zellen und macht sie sensitiver gegenüber K28. Ebenso verlieren Zellen, die ein lysinfreies K28-Derivat

exprimieren, welches folglich nicht mehr proteasomal abgebaut werden kann, ihre Immunität gegenüber K28. Versuche, bei denen Zellen verkürzte Formen des Toxinvorläufers exprimieren, konnten zeigen, dass K28 α zusammen mit der γ -Domäne die Immunitätsvermittelnden Komponenten von ptox darstellen. Die β -Untereinheit wird hingegen nicht zur Immunität benötigt. Der Toxinvorläufer erfüllt folglich zwei Funktionen: Zum einen wird er in das ER importiert und kann nach Prozessierung als reifes K28-Toxin in die Umgebung der Hefezelle sezerniert werden, zum anderen schützt er K28-produzierende Zellen vor dem eigenen Toxin, indem reinternalisiertes K28 im Zytosol abgefangen und degradiert wird (Eisfeld 2001, Breinig *et al.* 2006).

1.3.6 Der K28 α -induzierte Zellzyklusarrest

Im Gegensatz zu ionophoren Killertoxinen wie K1 oder Zygocin, die Poren in der Plasmamembran ausbilden, nutzt K28 einen weitaus komplexeren Mechanismus, um sensitive Zellen abzutöten. Diese zeigen nach Behandlung mit K28 einen terminalen Phänotyp, bei dem sie mit einer mittelgroßen Knospe (~60 % des Mutterzellvolumens) und präreplikativem DNA-Gehalt arretieren. Zudem befindet sich der Zellkern am Ansatz des Knospenhalses; der Spindelapparat ist nicht ausgebildet (Schmitt *et al.* 1996, Reiter 2004). Der beschriebene Phänotyp legt eine K28-induzierte Hemmung der Zellzyklusmaschinerie nahe, wenngleich es sich um einen untypischen Zellzyklusarrest handelt. Zellen, die mit präreplikativer DNA im Zellzyklus arretieren, besitzen gewöhnlich keine Knospe, da der Arrest in einer frühen Phase des Zellzyklus (späte G1- bis frühe S-Phase) auftritt (Hartwell 1974). Die Ausbildung einer Knospe deutet hingegen eher auf einen Arrest nach der S-Phase hin. Dieser Widerspruch zwischen morphologischem und physiologischem Erscheinungsbild deutet darauf hin, dass K28 möglicherweise eine pleiotrope Wirkung besitzt und die Zellzyklusmaschinerie an mehreren Stellen angreift. Durch zellbiologische Untersuchungen mit diversen Zellzyklusinhibitoren konnte der Zeitpunkt der Toxinwirkung näher eingegrenzt werden. K28-behandelte Zellen arretieren am Übergang von der G1- zur S-Phase, wobei der „Start“-Punkt überschritten ist (Schmitt *et al.* 1996). Bei der Suche nach potentiellen „Targets“ von K28 α durch Yeast-Two-Hybrid- (Y2H) und TAP-Analysen wurden insgesamt elf Proteine identifiziert, von denen mehrere an der Zellzyklusregulation beteiligt sind (Reiter 2004). Dabei sind im Besonderen die Proteine Ctr9p, Zds1p und Spt15p (TATA-Box-bindendes Protein, TBP) an der transkriptionellen Regulation der G1/S-Zyklusexpression beteiligt (Yu *et al.* 1996, Walker *et al.* 1997, Koch *et al.* 1999). Mit Apc2p wurde zudem eine Untereinheit des APC identifiziert, welcher als Multiproteinkomplex das Fortschreiten des Zellzyklus durch die M-Phase reguliert (Peters 2006). Von den weiteren potentiellen K28 α -„Targets“ spielt lediglich Cka2p eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklusregulation (Hanna

et al. 1995, Tripodi *et al.* 2007). Biochemisch konnte die Interaktion zwischen K28 α und Spt15p sowie Apc2p verifiziert werden. Um einen genaueren Einblick auf den Einfluss von K28 auf die Transkription der G1- und G1/S-Zykline zu erhalten, wurden Northern-Analysen durchgeführt, die zeigten, dass durch K28 die Menge der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p abnimmt. Die Überexpression dieser Regulatoren bewirkte im Falle von Cln2p eine komplette Resistenz der Zellen gegenüber K28. Bei einer Cln1p-Überexpression arretierten die Zellen nach K28-Behandlung erst in der G2-Phase. Dieser Arrest ist wahrscheinlich durch eine inhibitorische Wirkung von K28 α auf den APC zurückzuführen, da in Promotor-„shut-off“-Experimenten gezeigt werden konnte, dass durch K28 der Abbau von APC-Substraten (wie z. B. dem M-Zyklus Clb2p) gehemmt ist. Der Abbau der M-Phase-Zykline ist ein essentieller Schritt zur Einleitung des Abschlusses der Mitose (Reiter 2004). Bei einem „Screening“ von insgesamt 415 Hefemutanten, die eine Deletion in Zellzyklus-spezifischen Genen aufwiesen, wurden 18 Mutanten mit einer Hypersensitivität und 32 Mutanten mit einer verminderten Sensitivität gegenüber K28 identifiziert. Die Deletion der Proteine Elm1p, Shp1p, Ssn8p und Cse2p bewirkte dabei eine komplette Resistenz der Zellen. Insgesamt fällt bei einer funktionellen Einteilung der Deletionsmutanten auf, dass ein hoher Anteil an vermindert sensitiven Mutanten vorhanden ist, deren deletierte Gene für Kinasen oder Phosphatasen kodieren. Weitere sind an der Transkription, DNA-Reparatur, Knospung, der Zytokinese und am „Silencing“ beteiligt. Demgegenüber zeigten Mutanten mit einer erhöhten Sensitivität gegen K28 in vielen Fällen eine Deletion in Genen, die an der Zellzyklusregulation, an der Chromosomen- und SPB-Stabilität und an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Reiter 2004).

Da K28 aller Wahrscheinlichkeit nach seine toxische Wirkung durch Eingriff in den Zellzyklus oder dessen Regulation entfaltet, liegt die Vermutung nahe, dass der Nukleus den terminalen Wirkungsort von K28 α darstellt. Untermuert wird diese Annahme durch die Tatsache, dass es sich bei fünf der sechs mittels Y2H-Analyse ermittelten potentiellen Interaktionspartnern um nukleäre Proteine handelt. Die Untersuchung von Kernporenmutanten lieferte einen ersten Hinweis auf den Kernimport von K28 α . Deletionsmutanten, bei denen möglicherweise eine verkleinerte Kernpore vorliegt ($\Delta nup60$, $\Delta nup84$, $\Delta gfd1$) zeigten eine geringere Sensitivität gegenüber K28, wohingegen Mutanten mit einer vergrößerten Kernpore ($\Delta nup120$, $\Delta nup170$) sensitiver reagierten (Reiter 2004). Mit einem Molekulargewicht von 10,5 kDa ist eine passive Diffusion von K28 α durch die Kernporen in das Nukleoplasma prinzipiell möglich. Eine Beteiligung einzelner Importine am Kernimport von K28 α konnte durch Reiter 2004 ausgeschlossen werden. Ein intrazellulär exprimiertes K28 α -Letalkonstrukt (siehe 1.3.7) mit einer zusätzlichen Kernlokalisationssequenz (prä-NLS-TEV- α) zeigte eine gesteigerte Toxizität. Diese wurde sogar um ein Vielfaches erhöht, wenn das Konstrukt lediglich den Aufbau NLS-TEV- α aufwies (Reiter 2004, Volz 2005).

Trotz der vielen indirekten Hinweise auf eine Kernlokalisation von K28 α konnte diese bisher nicht direkt bestätigt werden. So ist die Möglichkeit nicht vollständig auszuschließen, dass sich die toxische Wirkung von K28 α im Zytosol manifestiert. Interessanterweise sind mit Zymocin aus *K. lactis* und PaT aus *P. acaciae* zwei weitere Killertoxine bekannt, deren toxische Wirkungen auf einem Zellzyklusarrest in der späten G1- (Zymocin) bzw. in der frühen S-Phase (PaT) beruhen. Beide Toxine entfalten ihre toxische Wirkung im Zytosol, indem sie als tRNA-Anticodon-Nukleasen distinkte tRNAs spezifisch schneiden und die dadurch hervorgerufene Hemmung der Proteinbiosynthese in einem Zellzyklusarrest resultiert (Lu *et al.* 2005, Klassen *et al.* 2008, Studte *et al.* 2008).

Entscheidend für die Wirkung von K28 ist dessen Konzentration, der sensitive Zellen ausgesetzt sind. Hohe Toxinkonzentrationen oberhalb von 10 pM verursachen den bereits beschriebenen Zellzyklusarrest. Toxinkonzentrationen unterhalb von 1 pM induzieren hingegen eine Apoptose-vermittelte Abtötung der Zellen. Die typischen Apoptosemarker wie DNA-Fragmentierung, Chromosomenkondensation, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und eine Veränderung der Plasmamembranzusammensetzung konnten in diesem Zusammenhang eindeutig identifiziert werden. Ebenso war es möglich, eine Beteiligung der Metacaspase Yca1p in einem frühen Stadium der Apoptose nachzuweisen, da $\Delta yca1$ -Deletionsmutanten eine verminderte Sensitivität gegenüber K28 zeigten und dabei auch die Apoptosemarker stark reduziert auftraten (Reiter 2004, Reiter *et al.* 2005, Schmitt & Reiter 2008). Für die Killertoxine K1 und PMKT („*Pichia membranifaciens* Killer Toxin“), die beide ihre Wirkung auf Ebene der Plasmamembran entfalten, konnte ebenso eine Induktion der Apoptose in sensitiven Zellen nachgewiesen werden (Ivanovska & Hardwick 2005, Santos & Marquina 2011). Mit dem aus *P. acaciae* stammenden Toxin PaT und PMKT aus *P. membranifaciens* sind zwei weitere Zellzyklus-arretierende Toxine bekannt, die zur Abtötung ebenfalls Apoptose induzieren können (Klassen & Meinhardt 2005, Santos & Marquina 2011). Die Beispiele machen deutlich, dass die Apoptose einen wichtigen Prozess zur Abtötung sensibler Hefezellen darstellt. Es ist davon auszugehen, dass die Apoptoseinduktion durch Killertoxine in den natürlichen Wachstumsumgebungen der Killerhefen eine größere Rolle spielt als ionophore oder Zellzyklus-arretierende Mechanismen, da die Toxine unter natürlichen Bedingungen eher in geringeren Konzentrationen vorkommen (Reiter *et al.* 2005, Büttner *et al.* 2006).

1.3.7 Intrazelluläre Expression der toxischen α -Untereinheit

Bei K28 handelt es sich um ein A/B-Toxin, dessen A-Untereinheit K28 α die toxische Komponente repräsentiert. Bei vielen A/B-Toxinen ist bekannt, dass die alleinige Expression der toxischen A-Untereinheit in sensitiven Zellen zu deren Absterben führt. Dieser sogenannte „Selbstkillerphänotyp“ kann z. B. bei dem Pflanzentoxin Ricin beobachtet werden. Die intrazelluläre Expression der toxischen Komponente RTA führt sowohl bei Hefe- als auch bei Säugerzellen zu einer Abtötung der Zellen (Schnöder 2009, Becker & Schmitt 2011). Weitere Beispiele finden sich bei den Killertoxinen PaT (Klassen *et al.* 2008) und Zymocin (Tokunaga *et al.* 1989) sowie dem Diphtherietoxin (Palmiter *et al.* 1987). Auch im Falle von K28 führt die intrazelluläre Expression der α -Untereinheit zu einer Wachstumshemmung (Sendzik 2003). Notwendig für die Toxizität ist dabei der Import von K28 α in das ER, da nur K28 α -Varianten mit prä-Domäne eine toxische Wirkung zeigen. Eine zytosolische Expression von K28 α führt zu keinem toxischen Effekt (Sendzik 2006, Kelkel 2009). Weiterhin zeigen die Signalpeptidasemutanten $\Delta spc1$ und $\Delta spc2$ eine Resistenz gegenüber der intrazellulär exprimierten K28 α -Variante präpro α , womit ebenfalls der ER-Import als Voraussetzung für die Toxizität untermauert ist. Die Frage, warum K28 α erst nach ER-Import seine Toxizität entfaltet, ist nicht vollständig geklärt. Möglicherweise erfährt die toxische Untereinheit im ER posttranslationale Modifikationen oder eine Konformationsänderung, die für die toxische Wirkung essentiell sind. Das Konstrukt NLS-TEV- α stellt dabei die bisher einzige bekannte Ausnahme dar, da es als einzige K28 α -Variante ohne ER-Signalsequenz eine deutliche Toxizität ohne vorherigen ER-Import zeigt (Reiter 2004, Sendzik 2006). Die pro-Domäne ist bei intrazellulärer Expression entbehrlich. Interessanterweise wird K28 α nach ER-Import nicht sezerniert, sondern durchläuft den Sekretionsweg lediglich bis zum Golgi-Apparat und von dort zurück in das Zytosol. Der Nachweis der α -Domäne bei Expression von präpro α bestätigt den Transport zum Golgi-Apparat, da erst dort die pro- von der α -Domäne durch die Endopeptidase Kex2p getrennt wird. Ebenso gibt es Hinweise auf eine Beteiligung COPII-bedeckter Vesikel beim Transport von pro α vom ER zum Golgi-Apparat (Kelkel 2009). Da bisher kein direkter Exportprozess aus dem Golgi-Apparat in das Zytosol bekannt ist, wird davon ausgegangen, dass K28 α aus dem Golgi-Apparat retrograd in das ER zurücktransportiert wird und von dort die Retrotranslokation in das Zytosol erfolgt. Ein Modell, nach dem intrazellulär exprimiertes K28 α im Vergleich zu wildtypischem K28 andere Mechanismen zur ER-Zytosol-Retrotranslokation nutzt (Kelkel 2009), konnte bisher experimentell nicht bestätigt werden (Müller, persönliche Mitteilung). Der Retrotranslokationsprozess von K28 und K28 α ist zurzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen.

1.4 Ziele und Fragestellungen der Arbeit

K28 ist ein viral kodiertes Killertoxin der Hefe *S. cerevisiae*, das bei sensitiven Hefezellen einen Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase induziert. Trotz intensiver Untersuchungen ist die molekulare Grundlage des K28-induzierten Zellzyklusarrests noch nicht vollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit sollten zwei grundlegende Fragen adressiert werden. Zum einen lag der Fokus auf der *in vivo* Lokalisation der toxischen K28-Untereinheit α , zum anderen sollte geklärt werden, durch welche molekularen Mechanismen der Zellzyklus durch K28 arretiert. Beide Fragestellungen wurden bereits intensiv von Reiter (2004) bearbeitet.

In Bezug auf die Lokalisation von K28 α konnte in den Untersuchungen von Reiter der Zellkern als terminaler Wirkungsort des Toxins durch K28 α -Varianten mit NLS-Sequenz indirekt nachgewiesen werden. Die Anzahl an K28 α -Varianten mit NLS- und NES-Sequenzen sollte zunächst erweitert werden, um durch den forcierten Kernimport oder -export die Ergebnisse von Reiter zu bestätigen und zu ergänzen. Aufbauend auf diesen Versuchen sollte die nukleäre Lokalisation durch verschiedene mikroskopische Techniken verifiziert werden. Dabei sollten Fusionsproteine bestehend aus K28 α und dem Fluoreszenzprotein mRFP hergestellt werden, um die toxische K28 α -Untereinheit fluoreszenzmikroskopisch im Nukleus lebender Hefezellen nachzuweisen. Die Bestätigung der nukleären Lokalisation von wildtypischem K28 α sollte mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie sowie durch Immunogold-Elektronenmikroskopie erfolgen.

Bei den Untersuchungen zum K28-induzierten Zellzyklusarrest sollten zunächst die von Reiter als potentielle Interaktionspartner von K28 α identifizierten Proteine *in vivo* bestätigt werden. Der Nachweis der Interaktionen sollte dabei in lebenden Hefezellen mit Hilfe der „Bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsanalyse“ (BiFC) erfolgen. Um mögliche weitere „Targets“ von K28 α zu identifizieren und um das Verständnis des K28-induzierten Zellzyklusarrests zu erweitern, sollten zum einen Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* und zum anderen Hefestämme, die wichtige Zellzyklus-regulatorische Proteine überexprimieren, auf eine veränderte Sensitivität gegenüber K28 untersucht werden. Resistente oder hypersensitive Stämme sollten dabei einen Hinweis auf den Wirkmechanismus von K28 geben. Reiter konnte in seiner Arbeit (2004) einen Effekt von K28 auf die Transkription der G1/S-Zykline beobachten. Um einen Gesamtüberblick über den Einfluss von K28 auf die globale Transkription Zellzyklus-regulierter Gene zu erhalten, sollte eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq von Toxin-behandelten *S. cerevisiae* Zellen durchgeführt werden. Die so gewonnenen Daten sollten zeigen, welche Gene nach K28-Behandlung herunter- bzw. hochreguliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien-Stämme

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen und sind in Tabelle 1 aufgeführt. TOP10F'- und NovaBlue Singles-Zellen wurden zur TA-Klonierung, TOP10-Zellen für Standard-Klonierungen eingesetzt.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme, deren Herkunft und Genotyp

Name	Genotyp	Herkunft/Referenz
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen
TOP10F'	F'[lacI ^q Tn10(tet ^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	Invitrogen
NovaBlue Singles	endA1 hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15::Tn10] (Tet ^R)	Novagen

2.1.2 Hefe-Stämme

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefe-Stämme wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen und sind in Tabelle 2 aufgeführt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Deletionsmutanten der Firma OPEN BIOSYSTEMS.

Tabelle 2: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete *S. cerevisiae* Stämme, deren Genotyp und Herkunft

Name	Genotyp	Herkunft/Referenz
SEY6210	Mat α leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 suc2-Δ9 lys2-801; GAL	Robinson <i>et al.</i> 1988
BY4742	Mat α ; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0 (Wildtypstamm zu den Deletionsmutanten)	Brachmann <i>et al.</i> 1998 Open Biosystems
S86c	MAT α ura3-2 leu2 his3 pra1 prb2 prc1 cps1	Schmitt & Schernikau 1997
AVY017	Mat α ade2, lys2, trp1, his3, ura3, leu2, bar1, arf1-4::HIS3, arf2Δ::URA3, arf3Δ::LEU2 Sec7-mChe-V5::KAN	Reggiori (unveröffentlicht)
192.2d	MAT α ura3 leu2	Schmitt <i>et al.</i> 1996
CWY747	TPP1::GAL1-CLN3 cln1Δ cln2Δxs cln3Δ pep4::LEU2	de Bruin <i>et al.</i> 2004

Name	Genotyp	Herkunft/Referenz
CWY231	<i>ade1 leu2-3,112 his2 trp1-1 ura3Δns bar1Δ</i>	de Bruin <i>et al.</i> 2004
MS300c	<i>Matα leu2 ura3-52 ski2-2</i> K28-Superkiller	Schmitt & Tipper 1990
T158c	<i>Matα his4</i> K1-Superkiller	Bussey <i>et al.</i> 1979 Valis <i>et al.</i> 2006

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten *S. cerevisiae* Deletionsmutanten. Die Stämme wurden von der Firma OPEN BIOSYSTEMS bezogen. (Wildtypstamm: BY4742)

Gendeletion	ORF	Gendeletion	ORF
<i>SPT8</i>	YLR055C	<i>ADA2</i>	YDR448W
<i>RAD52</i>	YML032C	<i>SSN2</i>	YDR443C
<i>MFT1</i>	YML062C	<i>CHD1</i>	YER164W
<i>YKU70</i>	YMR284W	<i>NUT1</i>	YGL151W
<i>SGS1</i>	YMR190C	<i>RAD54</i>	YGL163C
<i>MRE11</i>	YMR224C	<i>SOH1</i>	YGL127C
<i>UBP8</i>	YMR223W	<i>IKI3</i>	YLR384C
<i>TEX1</i>	YNL253W	<i>GCN5</i>	YGR252W
<i>GAL11</i>	YOL051W	<i>SPT20</i>	YOL148C
<i>HFI1</i>	YPL254W	<i>SGF29</i>	YCL010C
<i>ELP4</i>	YPL101W	<i>SIN4</i>	YNL236W
<i>RAD55</i>	YDR076W	<i>THO2</i>	YNL139C
<i>SNF11</i>	YDR073W	<i>ROX3</i>	YBL093C
<i>SPT3</i>	YDR392W	<i>KT12</i>	YBR023C
<i>MUS81</i>	YDR386W	<i>KT16</i>	YDR072C
<i>ELP2</i>	YGR200C	<i>KT112</i>	YKL110C
<i>THP2</i>	YHR167W	<i>KT113</i>	YAL020C
<i>ASK10</i>	YGR097W	<i>DPH1</i>	YIL103W
<i>LEO1</i>	YOR123C	<i>DPH2</i>	YKL191W
<i>SRB5</i>	YGR104C	<i>CTR9</i>	YOL145C
<i>SWI3</i>	YJL176C	<i>CTK1</i>	YKL139W
<i>CDC73</i>	YLR418C	<i>CTK3</i>	YML112W
<i>NGG1</i>	YDR176W	<i>ELP3</i>	YPL086C
<i>RTF1</i>	YGL244W	<i>TRM9</i>	YML014W
<i>SGF11</i>	YPL047W	<i>TRM1</i>	YDR120C
<i>SSN3</i>	YPL042C	<i>TRM2</i>	YKR056W
<i>SGF73</i>	YGL066W	<i>TRM4</i>	YBL024W
<i>RPB9</i>	YGL070C	<i>TRM11</i>	YOL124C
<i>PGD1</i>	YGL025C	<i>TRM12</i>	YML005W
<i>DST1</i>	YGL043W	<i>TRM3</i>	YDL112W
<i>LIF1</i>	YGL090W	<i>TRM10</i>	YOL093W
<i>LOS1</i>	YKL205W	<i>TRM44</i>	YPL030W
<i>SWP82</i>	YFL049W	<i>TRM82</i>	YDR165W
<i>SNF6</i>	YHL025W	<i>TRM13</i>	YOL125W
<i>RAD51</i>	YER095W	<i>MEI5</i>	YPL121C
<i>YKU80</i>	YMR106C	<i>RPA12</i>	YJR063W
<i>ELP6</i>	YMR312W	<i>DCR2</i>	YLR361C
<i>RAD50</i>	YNL250W	<i>GID8</i>	YMR135C
<i>MED1</i>	YPR070W	<i>HTL1</i>	YCR020W-B
<i>SRB2</i>	YHR041C	<i>RSC1</i>	YGR056W
<i>SRB8</i>	YCR081W	<i>RSC2</i>	YLR357W
<i>PAF1</i>	YBR279W	<i>LDB2</i>	YDR414C
<i>RAD57</i>	YDR004W	<i>NPL6</i>	YMR091C
<i>IWR1</i>	YDL115C	<i>RTT102</i>	YGR275W
<i>SSN8</i>	YNL025C	<i>SNF2</i>	YOR290C
<i>CSE2</i>	YNR010W	<i>ELM1</i>	YKL048C
<i>SNF12</i>	YNR023W	<i>SKN7</i>	YHR206W

Gendeletion	ORF
<i>RPB4</i>	YJL140W
<i>SPT4</i>	YGR063C
<i>SNF5</i>	YBR289W
<i>SPT7</i>	YBR081C
<i>RAD59</i>	YDL059C
<i>MED2</i>	YDL005C

Gendeletion	ORF
<i>DOA10</i>	YIL030C
<i>NUP60</i>	YAR002W
<i>NUP84</i>	YDL116W
<i>NUP120</i>	YKL057C
<i>NUP170</i>	YBL079W
<i>GFD1</i>	YMR255W

2.2 Plasmide

Tabelle 4 zeigt die Plasmide, die zur TA-Klonierung oder als PCR-Template eingesetzt wurden. In Tabelle 5 sind die Plasmide aufgeführt, die zur Expression in *S. cerevisiae* verwendet wurden. Die Vektorkarten zu den Plasmiden, die zur Zwischenklonierung und als Ausgangsvektoren für Ligationen verwendet wurden, sind in Abbildung 4 dargestellt. Die Vektoren pRS316-Erd2.6 und pRS316-Erd2.93 basieren auf dem Zentromervektor pRS316 (Sikorski & Hieter 1989) und enthalten den Promotor P_{GAL1} und den *CYC1*-Terminator, wodurch eine induzierbare Expression in *S. cerevisiae* möglich ist (Gießelmann 2007). Eine schematische Darstellung dieser Vektoren findet sich in Abbildung 5.

Tabelle 4: Grundvektoren zur TA-Klonierung bzw. PCR, deren Eigenschaften und Herkunft.

	Plasmid	Größe (kB)	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
1	pYES2.1/V5-His-TOPO	5,9	„TA-Cloning-Site“, <i>GAL1</i> -Promotor, pUC origin, 2 μ origin, f1 origin, Amp ^R , <i>URA3</i> -Marker, Hefeexpressionsvektor	INVITROGEN
2	pSTBlue-1	3,9	„blunt end cloning site“, MCS, SP6-, T7-Promotor, f1 origin, pUC origin, Kan ^R , Amp ^R , <i>lacZ</i> α -Peptid zur Blau-Weiß-Selektion	NOVAGEN
3	pPGK-M28I	6,9	pDT-PGK mit K28-ORF (<i>XhoI/BglII</i> -Fragment), oriE, Amp ^R , 2 μ , <i>URA3</i> -Marker,	Schmitt & Tipper 1995
4	pFB2-mRFP	7,7	pFB2 mit mRFP-ORF (<i>EcoRI/SalI</i> -Fragment), 2 μ origin, oriE, Amp ^R , <i>URA3</i> -Marker, pPGK-Promotor	Diehl (unveröffentlicht)
5	pESC ^{Leu}	7,8	2 MCS, Amp ^R , 2 μ origin, pUC origin, f1 origin, <i>LEU2</i> -Marker, <i>GAL1/GAL10</i> -Dualpromotor,	STRATAGENE

Tabelle 5: Verwendete Plasmide für *S. cerevisiae* und *E. coli*. Grundvektoren, erstellte Vektoren, deren Eigenschaften und Herkunft.

	Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
1	pESC ^{Trp} -prä-NLS-TEV- α^R	pESC ^{Trp} mit prä-NLS-TEV- α^R unter Kontrolle von P_{GAL10}	Reiter 2004
2	pESC ^{Trp} -NLS-TEV- α^R	pESC ^{Trp} mit NLS-TEV- α^R unter Kontrolle von P_{GAL10}	Reiter 2004
3	pESC ^{Trp} -prä-NLS-TEV- α	pESC ^{Trp} mit prä-NLS-TEV- α unter Kontrolle von P_{GAL10}	Reiter 2004
4	pYES2.1-NLS-TEV- α^R	pYES2.1 mit NLS-TEV- α^R unter Kontrolle von P_{GAL1}	Reiter 2004
5	pYES2.1-NLS-TEV- α	pYES2.1 mit NLS-TEV- α unter Kontrolle von P_{GAL1}	Reiter 2004

	Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/ Referenz
40	pRS315-präMNK28 α	pRS315 mit P_{GAL1} -Promotor, $CYC1$ -Terminator, BiFC-Fängerkonstrukt aus K28prä-Sequenz, N-terminalen Teil von mCherry Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT) und K28 α	diese Arbeit
41	pRS316-MCnLi	pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, $CYC1$ -Terminator, BiFC-„Beutekassette“ aus N-terminalem Teil von mCherry und Linkersequenz (GGTGGTGGTGGT TCTGGTGGTGGTGGTTCT)	Schäuble 2008
42	pRS316-LiMCc	pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, $CYC1$ -Terminator, BiFC-„Beutekassette“ aus Linkersequenz (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT) und C-terminalem Teil von mCherry	Schäuble 2008
43	pSTBlue-1-APC2	pSTBlue-1 mit <i>APC2</i>	diese Arbeit
44	pSTBlue-1-SPT15	pSTBlue-1 mit <i>SPT15</i>	diese Arbeit
45	pRS316-MCAPC2	pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, $CYC1$ -Terminator, BiFC-„Beutekonstrukt“ aus N-terminalem Teil von mCherry Linkersequenz (GGTGGTGGTGGT TCTGGTGGTGGTGGTTCT) und <i>APC2</i>	diese Arbeit
46	pRS316-SPT15MC	pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, $CYC1$ -Terminator, BiFC-„Beutekonstrukt“ aus <i>SPT15</i> , C-terminalem Teil von mCherry und Linkersequenz (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT)	diese Arbeit
47	pRS315-MN	pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, N-terminalem Teil von mCherry, $CYC1$ -Terminator	Schäuble 2008
48	pRS316-MC	pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, C-terminalem Teil von mCherry, $CYC1$ -Terminator	Schäuble 2008
49	pRS315-LiMNCsis1	pRS315 mit P_{GAL1} -Promotor, $CYC1$ -Terminator, BiFC-„Beutekonstrukt“ aus <i>SIS1</i> , Linkersequenz (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT), und N-terminalem Teil von mCherry	Schäuble 2008
50	pRS316-LiMCcSis1	pRS316 mit P_{GAL1} -Promotor, $CYC1$ -Terminator, BiFC-„Beutekonstrukt“ aus <i>SIS1</i> , Linkersequenz (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT), und C-terminalem Teil von mCherry	Schäuble 2008
51	pYES2.1-RPB4	pYES2.1 mit <i>RPB4</i>	diese Arbeit
52	pYES2.1-RPB9	pYES2.1 mit <i>RPB9</i>	diese Arbeit
53	pSTBlue-1-PCLN2	pSTBlue-1 mit P_{CLN2} (-610 bp) und <i>CLN2</i>	diese Arbeit
54	pPGK-RAS	pPGK-RAS	Diehl (unver- öffentlicht)
55	pPCLN2	pPGK mit P_{CLN2} , <i>CLN2</i> , T_{PGK}	diese Arbeit
56	pYES2.1-SWI4	pYES2.1 mit <i>SWI4</i>	diese Arbeit
57	pYES2.1-SWI6	pYES2.1 mit <i>SWI6</i>	diese Arbeit
58	pSTBlue-1-SWI6	pSTBlue-1 mit <i>SWI6</i>	diese Arbeit
59	pYES2.1-MBP1	pYES2.1 mit <i>MBP1</i>	diese Arbeit
60	pYES2.1-SIC1	pYES2.1 mit <i>SIC1</i>	diese Arbeit
61	pYES2.1-CDC4	pYES2.1 mit <i>CDC4</i>	diese Arbeit
62	pYES2.1-CDC34	pYES2.1 mit <i>CDC34</i>	diese Arbeit
63	pSTBlue-1-ELM1	pSTBlue-1 mit <i>ELM1</i>	Thewes 2009
64	pSTBlue-1-CSE2	pSTBlue-1 mit <i>CSE2</i>	Thewes 2009
65	pSTBlue-1-SSN8	pSTBlue-1 mit <i>SSN8</i>	Thewes 2009
66	pSTBlue-1-SHP1	pSTBlue-1 mit <i>SHP1</i>	Thewes 2009
67	pYES2.1-CLN3	pYES2.1 mit <i>CLN3</i>	Thewes 2009
68	pYES2.1-ELM1	pYES2.1 mit <i>ELM1</i>	diese Arbeit
69	pYES2.1-CSE2	pYES2.1 mit <i>CSE2</i>	diese Arbeit
70	pYES2.1-SSN8	pYES2.1 mit <i>SSN8</i>	diese Arbeit
71	pYES2.1-SHP1	pYES2.1 mit <i>SHP1</i>	diese Arbeit
72	pYES2.1-präpro- α	pYES2.1 mit präpro- α unter Kontrolle von P_{GAL1}	Sendzik 2003

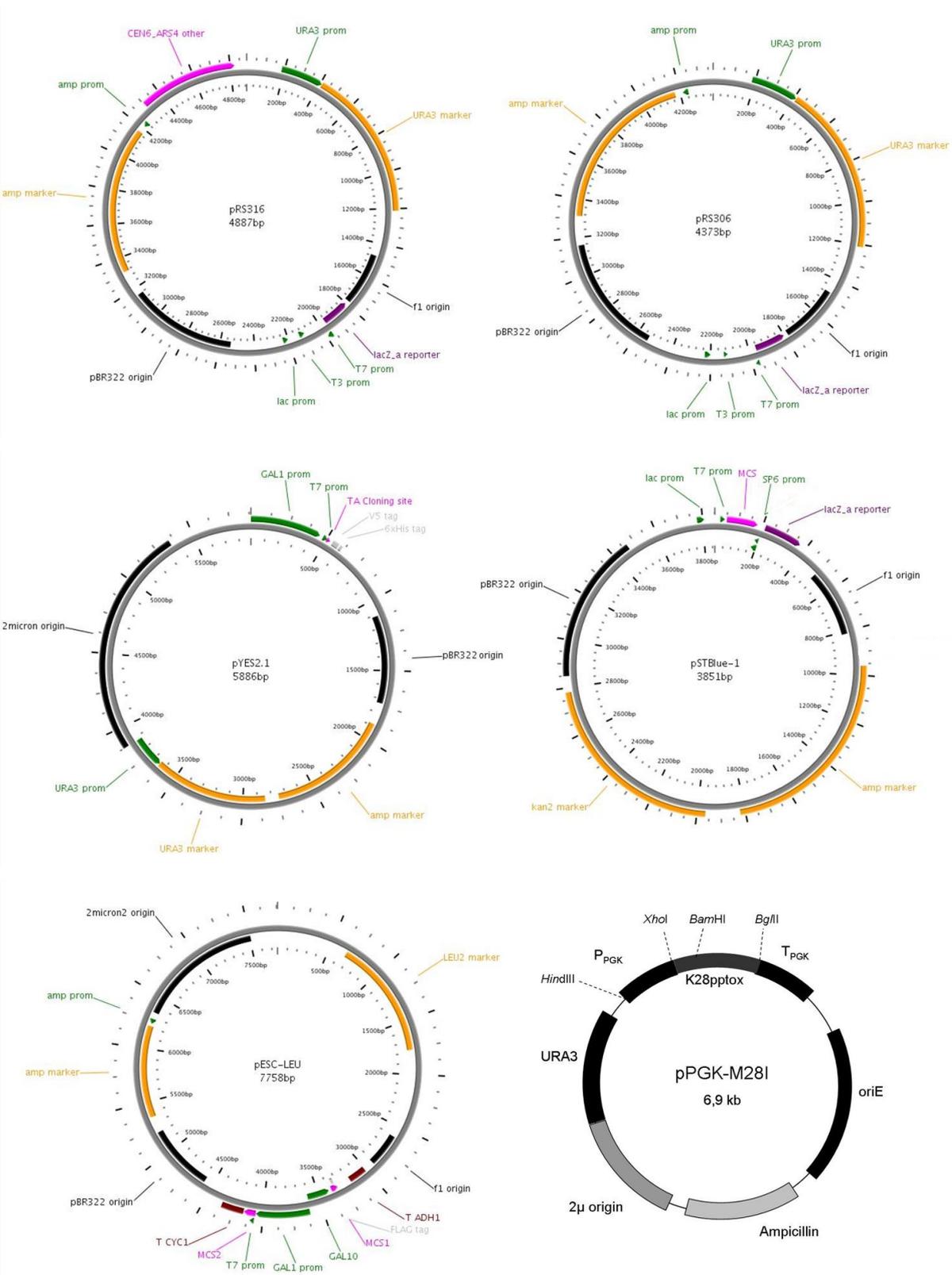


Abbildung 4: Vektorkarten der Grundplasmide, die zur Zwischenklonierung und für Ligationen verwendet wurden.

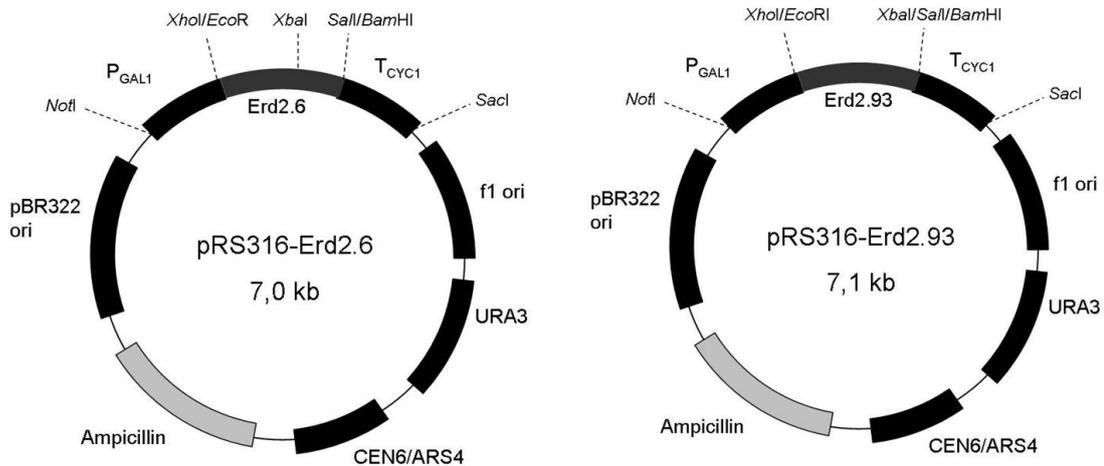


Abbildung 5: pRS316-basierte Zentromervektoren mit zusätzlicher Promotor- und Terminatorsequenz. Die Vektoren pRS316-Erd2.6 und pRS316-Erd2.93 (Gießelmann 2007) wurden zur Expression inklonierter Konstrukte verwendet.

2.3 Oligonukleotide

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden als Primer zur PCR verwendet und sind in Tabelle 6 aufgeführt. Das Design der Primer erfolgte mit Hilfe des Programmes Lasergene 7.0 der Firma DNASTAR; synthetisiert wurden die Primer von SIGMA-ALDRICH bzw. BIOMERS.

Tabelle 6: Oligonukleotide. Start- und Stoppcodons sind fettgedruckt; Schnittstellen für Restriktionsenzyme sowie eingefügte Sequenzen (NLS, NES, V5) sind unterstrichen. Die Orientierung der Primer ist in 5'→3'-Orientierung angegeben.

	Name	Sequenz (5'→3' Orientierung)
1	5'K28SS	<i>XhoI</i> <i>EcoRI</i> CTCGAG <u>GAATTC</u> ATG GAGAGCGTTTCCTCATTATTTAAC
2	5'SOE-präNLSK28 α	NLS GTTTCAAATCTCAAATATGCACGGGGT <u>CCTAAAAAAAAAAGAAGAGT</u> T GACTTCAGTGCTGCTACTTGCGTACTGATG
3	3'SOE-präNLSK28 α	NLS CATCAGTACGCAAGTAGCAGCACTGAAGTC <u>AACTCTTTTTTTTTTTT</u> TAGG <u>ACCCCGTGCATATTTGAGATTTGAAAC</u>
4	3'K28 α^R	<i>BglII</i> <i>SalI</i> <i>HindIII</i> <u>AGATCT</u> <u>GTCGAC</u> <u>AAGCTT</u> TTA ACGCGATTGTATATTCTCTGCGTTT TC
5	5'SOE-präNESK28 α	NES GTTTCAAATCTCAAATATGCACGGGGT <u>TTGGAAGGTAGAATTTTGGC</u> TGCTTTGACTTTG GACTTCAGTGCTGCTACTTGCGTACTGATG
6	3'SOE-präNESK28 α	NES CATCAGTACGCAAGTAGCAGCACTGAAGTC <u>CAAAGTCAAAGCAGCC</u> <u>AAAATTCTACCTTCAA</u> <u>ACCCCGTGCATATTTGAGATTTGAAAC</u>
7	3'K28 α^{R149A} NLS	<i>BglII</i> <i>SalI</i> <i>HindIII</i> NLS <u>AGATCT</u> <u>GTCGAC</u> <u>AAGCTT</u> TTA <u>AACTTTCTTTTTTTTTTTTAGG</u> ACGC GATTGTATATTCTCTGCGTTTTC

	Name	Sequenz (5'→3' Orientierung)
8	3'K28 ^{R149A} α ^{R149A} NES	<i>Bgl</i> II <i>Sal</i> I <i>Hind</i> III NES AGATCT <u>GTCGAC</u> <u>AAGCTT</u> TTA <u>CAAAGTCAAAGCAGCCAAAATTCT</u> ACCTTCCAA ACGCGATTGTATATTCTCTGCGTTTTTC
9	5'K28α	<i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI CTCGAG <u>GAATTC</u> ATG GACTTCAGTGCTGCTACTTGCG
10	5'SOE- K28αmRFP	GAAAACGCAGAGAATATAACAATCGCGT GCCTCCTCCGAGGAC
11	3'SOE- K28αmRFP	GTCCTCGGAGGAGGC ACGCGATTGTATATTCTCTGCGTTTTTC
12	3'mRFP	<i>Bgl</i> II <i>Sal</i> I <i>Hind</i> III AGATCT <u>GTCGAC</u> <u>AAGCTT</u> TTA GGCGCCGGTGGAG
13	5'NLS-K28α	<i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI NLS CTCGAG <u>GAATTC</u> ATG <u>CCTAAAAAAAAAAGAAAAGTT</u> GACTTCAGT GCTGCTACTTGCG
14	5'SOE- K28α ^{R149A} mRFP	GAAAACGCAGAGAATATAACAATCGGCG GCCTCCTCCGAGGAC
15	3'SOE- K28α ^{R149A} mRFP	GTCCTCGGAGGAGGC CGCCGATTGTATATTCTCTGCGTTTTTC
16	3'K28 ^{V5HDEL}	<i>Sal</i> I <i>Bgl</i> II V5 GTCGAC <u>AGATCT</u> TTA GCGTAGCTCATCGTG <u>CGTAGAATCGAGACC</u> <u>GAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACC</u> GCACCTTGCCTCGTCGTC ACC
17	3'K28 ^{HDELRV5}	<i>Sal</i> I <i>Bgl</i> II V5 GTCGAC <u>AGATCT</u> TTA <u>CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGG</u> <u>GATAGGCTTACC</u> GCGTAGCTCATCGTGGC
18	5'APC2	<i>Sal</i> I GTCGAC ATG TCATTTTCAGATTACCCCAACTCGAGA
19	3'APC2c	<i>Xba</i> I TCTAGA TCA TGAGTTTTTATGCCATTTTTCACTATTT
20	5'SPT15	<i>Sal</i> I GTCGAC ATG GCCGATGAGGAACGTTTAAAGG
21	3'SPT15n	<i>Paul</i> GCGCGC CATTTTTCTAAATTCACCTTAGCACAGGGTATATAGC
22	5'RPB4	<i>Xho</i> I CTCGAC ATG AATGTTTCTACATCAACCTTTCAAACAAGAC
23	3'RPB4	<i>Bgl</i> II <i>Sal</i> I <i>Hind</i> III AGATCT <u>GTCGAC</u> <u>TCTAGA</u> TTA ATAGAGTGTCTAGGTTTGACAA TCCTTTAGTATC
24	5'RPB9	<i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI CTCGAG <u>GAATTC</u> ATG ACTACGTTTAGATTTTGTCGTGACTGCA
25	3'RPB9	<i>Bgl</i> II <i>Sal</i> I <i>Hind</i> III AGATCT <u>GTCGAC</u> <u>TCTAGA</u> TCA TGAAAAGTGCCTTTTTGTTTTT TG
26	5'PCLN2	<i>Not</i> I GCGGCCGC TCATCGCGAAATTTGTCTCAACGGA
27	3'CLN2	<i>Bgl</i> II <i>Sal</i> I <i>Hind</i> III <i>Bam</i> HI AGATCT <u>GTCGAC</u> <u>TCTAGA</u> <u>GGATCC</u> CTA TACTACTTGGGTATTGCC CATACCAAAGAA
28	5'SWI4	<i>Xho</i> I <i>Eco</i> RI CTCGAG <u>GAATTC</u> ATG CCATTTGATGTTTTGATATCAAACCAA
29	3'SWI4	<i>Hind</i> III <i>Sal</i> I TCTAGA <u>GTCGAC</u> TTA TCGTTTTGCCCTCAAATCCTTTT
30	5'SWI6	<i>Xho</i> I CTCGAG ATG GCGTTGGAAGAAGTGGTACGATAC
31	3'SWI6	<i>Sal</i> I <i>Bam</i> HI GTCGAC <u>GGATCC</u> TCA TGAAGCATGCTTTTTTAAAAAATCTTG
32	5'MBP1	<i>Xho</i> I CTCGAG ATG TCTAACCAAATATACTCAGCGAGATATTCGG
33	3'MBP1	<i>Sal</i> I <i>Bam</i> HI GTCGAC <u>GGATCC</u> TTA TGCATGACTATTCGCGTTTGAGATTG
34	5'SIC1	<i>Sal</i> I GTCGAC ATG ACTCCTTCCACCCCAACCAAGG

	Name	Sequenz (5'→3' Orientierung)
35	3'SIC1	<i>HindIII</i> TCTAGA TCA ATGCTCTTGATCCCTAGATTGAAACAAT
36	5'CDC4	<i>SalI</i> GTCGAC ATG GGGTCGTTTCCCTTAGCT
37	3'CDC4	<i>Paul</i> GCGCGC TCA TGGTATTATAGTTGTCCTCGTTAGA
38	5'CDC34	<i>SalI</i> GTCGAC ATG AGTAGTCGCAAAGCACCG
39	3'CDC34	<i>HindIII</i> TCTAGA TTA TATTTTCTTTGAAACTCTTTCTACATCCTCC

2.4 Allgemeine Lösungen

Die Lösungen wurden in H₂O dest. gelöst.

70 % Ethanol

Ethanol 70 % (v/v)

10 % Glyzerin

Glyzerin 10 % (v/v)

Die Lösung wurde zur Sterilisation autoklaviert.

2.5 Nährmedien und allgemeine Kulturbedingungen

Alle Nährmedien wurden, wenn nicht anders angegeben, in H₂O dest. gelöst und zur Sterilisation autoklaviert. Die Lagerung von Agarplatten erfolgte bei 4 °C, Flüssigmedien wurden bei RT gelagert.

2.5.1 Bakterien

SOC-Medium

Hefeextrakt 0,5 %

Pepton 2 %

NaCl 10 mM

Glukose 20 mM

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

KCl 2,5 mM

Hefeextrakt, Pepton und NaCl wurden in H₂O dest. gelöst. Eine 250 mM KCl-Stammlösung wurde 1:10 verdünnt hinzugegeben. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7 durch 5 N NaOH wurde der Ansatz autoklaviert. Die Glukoselösung wurde getrennt autoklaviert. Beide Lösungen wurden nach Abkühlen vereinigt und durch Zugabe der entsprechenden Menge einer sterilfiltrierten 2 M MgCl₂-Lösung komplettiert.

LB-Medium

Pepton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
(Agar	1,2 %)

Ampicillin-Stammlösung

Ethanol	50 %
Ampicillin	50 mg/ml

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	25 mg/ml
-----------	----------

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal	40 mg/ml
-------	----------

gelöst in Dimethylformamid

Die Lösung wurde sterilfiltriert und dunkel bei -20 °C gelagert.

IPTG-Stammlösung

IPTG	100 mM
------	--------

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C und 220 rpm auf einem Rundschtüttler (INFORS) in LB-Flüssigmedium über Nacht. LB-Platten wurden ü. N. im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Zur Selektion Plasmid-tragender *E. coli* Kulturen wurde den Flüssigkulturen und Agarplatten in Abhängigkeit des entsprechenden Plasmids Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 µg/ml zugegeben.

Zum Blau-Weiß-Screening wurden zusätzlich 40 µl X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml) und 40 µl IPTG-Stammlösung (100 mM) auf die Agarplatten aufgebracht.

2.5.2 Hefen

YPD-Medium

Hefeextrakt	1 %
Pepton	2 %
Glukose	2 %
(Agar	1,5 %)

Die Glukose-Lösung wurde getrennt autoklaviert.

YPCCa-Medium (1 l)

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Zitronensäure	2,1 g
Glukose	20 g
CaCl ₂	5,55 g

Alle Bestandteile des Mediums außer Glukose und CaCl₂ wurden gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 4,7 eingestellt. Die Glukose-Lösung und das Medium wurden getrennt autoklaviert. Die CaCl₂-Lösung wurde sterilfiltriert und das Medium mit Glukose- und CaCl₂-Lösung komplettiert.

Synthetisches Medium (SC-Medium) bzw. „Drop-out“-Medium (1 l)

Lösung A:

SC- bzw. d/o-Mix	0,85 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
H ₂ O dest.	ad 0,8 l

Lösung B:

“YNB w/o aminoacids and ammonium sulphate”	1,7 g
H ₂ O dest.	ad 0,05 l

Lösung C:

Glukose	20 g
(Galaktose	30 g)
(Raffinose	30 g)
(Agar	14 g)
H ₂ O dest.	ad 0,15 l

Die Lösungen A, und C wurden getrennt autoklaviert; Lösung B wurde sterilfiltriert. Nach Abkühlen der Lösungen auf etwa 50 °C wurden die Lösungen A, B und C vereinigt. Je nach Verwendungszweck enthielt Lösung C eine der angegebenen Kohlenstoffquellen.

SC- bzw. „Drop-out“-Mix

Adenin	0,2 g	L-Threonin	2,0 g
L-Arginin	0,2 g	L-Tryptophan	0,2 g
L-Histidin x HCl x H ₂ O	0,2 g	L-Tyrosin	0,3 g
L-Isoleucin	0,3 g	Uracil	0,2 g
L-Leucin	1,0 g	L-Valin	1,5 g
L-Lysin	0,3 g		
L-Methionin	0,2 g		
L-Phenylalanin	0,5 g		

Zur Herstellung von selektierendem „Drop-out“-Pulver wurde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) bzw. Base(n) ausgelassen. SC- und d/o-Pulver wurden bei 4 °C gelagert.

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte in dem entsprechenden Flüssigmedium bei 30 °C und 220 rpm auf einem Rundschüttler (INFORS). Ausplattierte Hefen wurden bei 30 °C kultiviert.

2.5.3 Dauerkulturen

Sowohl *E. coli* als auch Hefezellen können als Kryokultur über mehrere Jahre gelagert werden. Zur Herstellung einer Kryokultur wurden 1 ml frische Übernachtskultur mit 1 ml sterilem 99 %igem Glycerin gemischt und in einem sterilen Kryoröhrchen (NALGENE CRYOWARE) bei -80 °C gelagert.

2.6 Zellzahlbestimmung

2.6.1 Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl von *S. cerevisiae* Kulturen erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm).

2.6.2 Optische Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterien- bzw. Hefezellsuspensionen erfolgte durch Extinktionsmessungen mit Hilfe des „Ultrospec 2100 *pro* UV/Visible Spectrophotometer“ (AMERSHAM BIOSCIENCE) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm. Als Referenzwert wurde das jeweilige unbeimpfte Medium verwendet. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm.

2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die 1968 von Kary B. Mullis entwickelte Polymerase Chain Reaction ist ein häufig angewendetes *in vitro*-Verfahren zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Dazu werden zwei Oligonukleotid-Primer konstruiert, die gegenläufig an komplementäre DNA-Sequenzen binden und die zu vervielfältigende Sequenz einschließen (Saiki *et al.* 1988). Meistens werden thermostabile DNA-Polymerasen von dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), verwendet, die beim Erhitzen während der PCR-Zyklen nicht denaturiert werden. Neben der Polymerase werden für einen PCR-Ansatz der zu vervielfältigende DNA-Doppelstrang („template DNA“), 5'- und 3'-Primer, Desoxyribonukleotide (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) sowie im PCR-Puffer gelöste Mg^{2+} -Ionen benötigt. Der PCR-Prozess besteht aus ca. 25-30 Zyklen mit jeweils drei definierten Schritten. Im Denaturierungsschritt wird der Ansatz auf 95 °C erhitzt, so dass sich die DNA-Stränge voneinander trennen. Beim anschließenden „annealing“ wird die Temperatur so gewählt, dass sich die Primer an ihre entsprechende komplementäre Sequenz der „template DNA“ anlagern. Die Wahl der Temperatur richtet sich dabei nach den verwendeten Primern und liegt 2-3 °C unter dem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65 °C. Als letztes folgt bei 72 °C der „Elongations-Schritt“, bei dem die DNA-Polymerase am jeweiligen 3'-Ende der beiden Primer mit der Anlagerung von Nukleotiden beginnt. Mit jedem Zyklus steigt die Anzahl der neu synthetisierten DNA-Sequenzen exponentiell an. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt und wurden von der Firma SIGMA hergestellt.

2.7.1 Standard-PCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene DNA-Polymerasen verwendet. Grundsätzlich kamen DNA-Polymerasen mit „Proof-Reading“-Funktion zum Einsatz, wenn die Amplifikate nach erfolgreicher PCR und TOPO-Klonierung sequenziert wurden, um die Wahrscheinlichkeit einer Mutation zu minimieren. Verwendung fanden dabei das „FastStart High Fidelity PCR System“ (ROCHE), das „Expand High Fidelity PCR System“ (ROCHE) und die „Phusion High Fidelity Taq Polymerase“ (NEB). Die *Taq*-Polymerase (SIGMA) kam zum Einsatz, wenn auf die „Proof-Reading“-Funktion verzichtet werden konnte, z.B. bei Kontroll-PCRs, die durchgeführt wurden, um beispielsweise das Vorhandensein einer Sequenz in einem Plasmid oder im Hefegenom zu überprüfen. Ein typischer PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Template-DNA	1 µl
10x Puffer	5 µl
5'-Primer (100 pmol/l)	0,5 µl
3'-Primer (100 pmol/l)	0,5 µl
dNTP-Mix (je 25 mmol/l)	0,4 µl
Polymerase	0,7 µl
H ₂ O dest.	ad 50 µl

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler „Primus 96 plus“ (MWG) bzw. im „Mastercycler eppgradients“ (EPPENDORF). Je nach Art der Template-DNA bzw. der verwendeten Polymerasen wurden verschiedene Parameter variiert. Genomische Hefe-DNA erforderte z.B. die Herabsenkung der „annealing“-Temperatur auf bis zu 45 °C. Genaue Angaben über die Temperaturoptima, Prozessivität und Zusammensetzung der PCR-Ansätze sind den Herstellerangaben der jeweiligen DNA-Polymerase zu entnehmen. Zur Amplifikation einer DNA-Sequenz wurde typischerweise folgendes PCR-Programm angewendet:

initiale Denaturierung	94 °C	4 min	} 25-30 x
Denaturierung	94 °C	30 s	
„Annealing“	45-55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s/kB	
terminale Elongation	72 °C	7 min	

Bei der Verwendung der „Phusion High Fidelity Taq Polymerase“ (NEB) wurden zum Anfügen von A-Überhängen (siehe Punkt 2.8) nach erfolgter PCR 0,7 µl *Taq*-Polymerase zum Ansatz pipettiert. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Inkubation bei 72 °C. Um den Erfolg einer

PCR zu überprüfen, wurden die fertigen PCR-Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.7.2 SOE-PCR

Die SOE-PCR („splicing by overlapping extensions“) stellt eine elegante Methode dar, die es erlaubt, mittels PCR Fusionsproteine auf DNA-Ebene zu klonieren, ohne dass Restriktionsendonukleasen verwendet werden müssen. Das Einfügen einer oder mehrerer Restriktionsschnittstellen zwischen den Fusionsprodukten ist somit nicht nötig.

In einem ersten PCR-Schritt werden zunächst in zwei getrennten Ansätzen die jeweiligen Gene amplifiziert. Die Primer, die dabei zum Einsatz kommen, fügen den PCR-Produkten an ihrem 3'- bzw. 5'-Ende eine etwa 30 bp lange überlappende, komplementäre Sequenz an. Diese Produkte dienen in einem zweiten PCR-Schritt als Template-DNA. Durch die komplementären Sequenzen lagern sich die beiden Fragmente zusammen und werden durch den Einsatz geeigneter 5'- und 3'-Primer amplifiziert (Horton *et al.* 1989).

Die Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen entsprechen den Angaben aus Punkt 2.7.1. Die Produkte aus dem ersten PCR-Schritt wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die entsprechenden Banden reisoliert und jeweils 5 µl als Template zur Herstellung des Fusionsproduktes im zweiten PCR-Schritt eingesetzt.

2.7.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ermöglicht eine erste Überprüfung, ob *E. coli* Zellen nach Transformation das richtige Ligationsprodukt enthalten. Die Bakterienzellen werden dabei direkt im PCR-Ansatz resuspendiert. Durch die hohe Temperatur des initialen Denaturierungsschrittes, sowie durch die Anwesenheit von DMSO im PCR-Ansatz, lysieren die Zellen, wodurch die Plasmid-DNA als Template zu Verfügung steht und amplifiziert werden kann.

Generell wurde ein Mastermix erstellt, der auf mehrere PCR-Gefäße aliquotiert wurde, um mehrere Kolonien zu testen. Pro Kolonie setzte sich ein PCR-Ansatz wie folgt zusammen:

10x Puffer	1 µl
DMSO	0,6 µl
5'-Primer (100 pmol/l)	0,1 µl
3'-Primer (100 pmol/l)	0,1 µl
dNTP-Mix (je 25 mmol/l)	0,1 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
H ₂ O dest.	ad 10 µl

E. coli Kolonien wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers von der Agarplatte in einen Reaktionsansatz überführt. Die PCR-Bedingungen sind Punkt 2.7.1 zu entnehmen. Die Ansätze wurden nach erfolgter PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Da die Anzahl falsch positiver Klone mit dieser Methode relativ hoch ist, mussten positive Klone erneut überprüft werden. Dazu wurden Kolonien, die eine richtige Bande anzeigten, von der ursprünglichen Agarplatte in flüssiges LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überimpf und die Plasmid-DNA nach alkalischer Lyse einem Restriktionsverdau unterzogen.

2.8 TA-Klonierung

Die TA-Klonierung ist eine gebräuchliche Methode, um nach einer PCR die amplifizierten Fragmente schnell und in einem Schritt in einen Vektor zu klonieren. Eine Voraussetzung dafür ist, dass die PCR-Produkte an ihren 3'-Enden dA-Überhänge besitzen, die z.B. bei der Verwendung der *Taq*-Polymerase entstehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur TA-Klonierung zwei verschiedene Kits angewendet. Die genauen Angaben zur Durchführung und Zusammensetzung der Reaktionsansätze sind den Herstellerangaben zu entnehmen.

2.8.1 AccepTor™-Klonierung

Der „AccepTor™ Vector Giga Kit“ (NOVAGEN) enthält das linearisierte Plasmid pSTBlue-1, das über 5'-dU-Überhänge verfügt, womit eine direkte Inserierung von Fragmenten mit 3'-dA-Überhängen ermöglicht wird. Die Ligationsprodukte wurden in NovaBlue Singles™ Competent Cells bzw. NovaBlue GigaSingles™ Competent Cells (NOVAGEN) transformiert. Der pSTBlue-1 Vektor erlaubt eine Selektion sowohl mit Kanamycin als auch mit Ampicillin und bietet die Möglichkeit zum Blau-Weiß-Screening (siehe Punkt 2.5.1). Weiterhin verfügt er über eine vielseitige MCS und daran flankierend SP6- bzw. T7-Promotor-Regionen, die zur Sequenzierung verwendet werden können.

2.8.2 pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit

Ein weiterer Vektor, der zur TA-Klonierung eingesetzt wurde, war der pYES2.1/V5-His-TOPO® Vektor, der ebenfalls linearisiert vorliegt und über 5'-dT-Überhänge verfügt. In diesem System ist der Vektor kovalent an Topoisomerase I des Vaccinia-Virus gebunden. Bei der Integration eines Inserts findet eine Umkehrreaktion statt, bei der die Bindung zwischen Topoisomerase I und Vektor-DNA gelöst wird. Die dabei freiwerdende Energie sorgt für eine effiziente Klonierung der PCR-Produkte. Die Ligationsprodukte wurden in *E. coli* TOP10F'-

Zellen transformiert. Ein Blau-Weiß-Screening der Klone ist mit diesem *E. coli* Stamm nicht möglich.

Bei dem pYES2.1/V5-His-TOPO[®] Vektor handelt es sich um einen Shuttle-Vektor, der durch die 2 μ -Sequenz in hoher Kopienzahl in *S. cerevisiae* vorliegt. Durch das Vorhandensein des P_{GAL1} -Promotors und einer Terminatorsequenz kann ein kloniertes Gen – bei richtiger Orientierung – direkt in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Durch entsprechende Standard-Sequenzen, die die Insertionsstelle flankieren, ist auch mit diesem Vektor eine Sequenzierung der Inserts möglich.

2.9 Sequenzierung

Die DNA-Sequenz aller in der vorliegenden Arbeit erstellten Konstrukte wurde zur Überprüfung auf Korrektheit sequenziert. Dazu wurden die PCR-Produkte in die Sequenziervektoren pYES2.1/V5-His-TOPO[®] bzw. pSTBlue-1 zwischenkloniert. Zeigte der Restriktionsverdau eines Klones die richtigen Banden an, wurde die Plasmid-DNA mittels Miniprep isoliert. Die Sequenzierreaktionen wurden von der Firma GATC BIOTECH durchgeführt. Die Sequenzauswertung erfolgte am PC mit Hilfe der Software „Lasergene[®] SeqMan“ (DNASTAR).

2.10 Plasmidisolierung aus *E. coli*

2.10.1 Alkalische Lyse

GTE-Lösung

Glukose	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
Na ₂ EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

NaOH/SDS-Lösung

NaOH	0,2 %
SDS	1 % (w/v)

5 M Kaliumacetat-Lösung pH 4,8

H₂O dest. 20 ml

Eisessig 99,5 % 29,5 ml

Der pH-Wert wurde mit KOH-„Plätzchen“ auf 4,8 eingestellt; das Endvolumen wurde mit H₂O dest. auf 100 ml aufgefüllt.

Die alkalische Lyse ist die gebräuchlichste Methode zur schnellen und einfachen Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen. Zur Anwendung kam dabei ein verändertes Protokoll nach Birnboim (1983).

Zur Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse wurden *E. coli* Zellen in 5 ml Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltigem LB-Flüssigmedium ü. N. bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Ein Volumen von 1,5 ml Zellkultur wurde bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl GTE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 5 min auf Eis belassen. Anschließend wurden 150 µl Kaliumacetat-Lösung zugegeben, der Ansatz wieder vorsichtig invertiert und 5 min auf Eis aufbewahrt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (7 min; 13.000 rpm; 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 800 µl Ethanol (100 %) zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min; 13.000 rpm; 20 °C) wurde der Überstand abgenommen und die pelletierte DNA getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde schließlich in 20 µl sterilem H₂O dest. aufgenommen. Zur Lagerung wurde die gelöste DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.10.2 Plasmid-Präparation mittels Plasmid-Miniprep Kit

Zur Gewinnung von hochreiner Plasmid-DNA wurde der „innuPREP Plasmid Mini Kit“ (ANALYTIK JENA BIO SOLUTIONS) verwendet. Das Prinzip beruht auf einer erweiterten alkalischen Lyse und schließt die Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamatrix an. In mehreren Waschschritten werden RNA, Proteine und weitere Verunreinigungen entfernt, wodurch die Plasmid-DNA einen hohen Reinheitsgrad aufweist.

Die genaue Durchführung der Plasmidisolierung mittels Mini-Prep wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 30 µl H₂O dest. Zur Lagerung wurde die isolierte Plasmid-DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.11 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe des „Ultrospec 2100 *pro* UV/Visible Spectrophotometer“ (AMERSHAM BIOSCIENCE). Dazu wurden 1:60 Verdünnungen (in H₂O dest.) der mittels Miniprep präparierten Plasmidlösungen hergestellt und deren UV-Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Referenzsubstanz wurde H₂O dest. verwendet; die Messungen erfolgten in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm.

2.12 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

„Breaking“-Puffer pH 8,0

Triton X-100	2 %
SDS	1 %
NaCl	100 mM
Tris pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

10x TE

Tris	100 mM
EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Zur Isolierung genomischer DNA aus Hefe wurden von einer frischen Übernachtskultur des jeweiligen *S. cerevisiae* Stammes 1,5 ml durch Zentrifugation (5 min; 9.000 rpm) geerntet und mit 1 ml H₂O dest. gewaschen. Das Pellet wurde in 40 µl „Breaking“-Puffer resuspendiert und mit 0,06 g Glasperlen (Ø=0,25-0,5 mm) und 70 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei 4 °C durch 3 x einminütiges Vortexen in einer Schwingmühle (RETSCH) bei maximaler Frequenz. Zum Ansatz wurden 40 µl 1x TE-Puffer gegeben, durch kurzes Vortexen gemischt und zur Trennung der Phasen 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß pipettiert und zur Fällung der DNA mit 1 ml 99 % Ethanol versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 min erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 1 min bei 13.000 rpm. Das DNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und in 40 µl H₂O dest. gelöst. Die so isolierte genomische Hefe-DNA wurde als Template für die PCR eingesetzt. Die langfristige Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.13 Restriktionsenzymatischer Verdau von Plasmid-DNA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsenzyme der Firma FERMENTAS, in wenigen Fällen der Firma ROCHE verwendet. Die Wahl des jeweiligen Puffers richtete sich nach den verwendeten Restriktionsendonukleasen und ist den Herstellerangaben zu entnehmen. Typischerweise wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl erstellt, die sich folgendermaßen zusammensetzten:

H ₂ O dest.	ad 20 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym 1	0,4 µl
Restriktionsenzym 2	0,4 µl
RNase A	0,1 µl
DNA (alkalische Lyse)	1-2 µl

Zum Verdau von DNA, die mittels Miniprep isoliert wurde, entfiel der Zusatz von RNase A. Die Menge an DNA wurde, falls nötig, auf bis zu 4 µl erhöht. Inkubiert wurden die Restriktionsansätze für 1-2 h bei 37 °C.

Zur Kontrolle eines Verdau und gegebenenfalls zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Restriktionsansatz, wurden diese in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und gegebenenfalls die DNA mittels „innuPREP Gel Extraction Kit“ (ANALYTIK JENA BIO SOLUTIONS) bzw. „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ (OMEGA BIO-TEK) isoliert.

2.14 Agarose-Gelelektrophorese

GLB-Puffer

Glyzerin (96 %)	50 % (w/v)
Na ₂ EDTA pH 8,3	125 mM
SDS	1 %
Bromphenol Blau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,05 % (w/v)

10x TBE-Puffer

Tris-HCl pH 8,3	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	0,02 M

Ethidiumbromid- Färbebad

Ethidiumbromid 0,0004 %

Die Agarosegelelektrophorese stellt ein physikochemisches Verfahren zur Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld dar und ist eine gängige Methode zur Auftrennung von DNA. Dabei „wandern“ die DNA-Moleküle in Abhängigkeit ihrer Nettoladung und somit ihrer Größe aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats im elektrischen Feld durch die Poren des Agarosegels in Richtung Anode.

Die gelelektrophoretische Auftrennung präparierter Plasmid-DNA erfolgte nach einer Vorschrift von Maniatis (Sambrook *et al.* 1989) in 0,8 %igen Agarosegelen in 1x TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm. Dazu wurden die DNA-Proben mit 1/5 Volumen GLB („gel loading buffer“) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in der Elektrophoreseapparatur „Blue Marine“ (BIORAD). Als DNA-Marker fand der „Hyperladder“ (BIOLINE) Anwendung.

Nach der Elektrophorese wurde die DNA in einer Ethidiumbromid-Lösung 15-20 min angefärbt. Durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) wird der Ethidiumbromid-DNA-Komplex zu einer orange-roten Fluoreszenz angeregt, wodurch die DNA-Banden im Gel sichtbar werden. Die Dokumentation der Gelbilder erfolgte mit dem „ChemIDoc XRS System“ (BIORAD).

2.15 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mittels „innuPREP Gel Extraction Kit“ (ANALYTIK JENA BIO SOLUTIONS) bzw. „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ (OMEGA BIO-TEK) durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht auf der reversiblen Adsorption von DNA an eine Glasfibrermembran.

Zur Reisolierung von DNA aus Agarosegelen wurden die durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemachten DNA-Banden aus dem Gel. Die Gelstücke wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben weiter behandelt. Beide Kits beruhen auf den gleichen Prinzipien: zunächst wurde die Agarose durch Zugabe eines chaotropen Puffers bei 60 °C geschmolzen und der Ansatz auf eine Säule gegeben. Die nach Zentrifugation an die Glasfibrermembran gebundene DNA wurde durch mehrmalige Waschschriffe mit den entsprechenden Waschpuffern von Salzen und organischen Molekülen befreit und anschließend mit 30-40 μl H₂O dest. eluiert. Zur langfristigen Lagerung wurde die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.16 Ligation

Durch den Einsatz von DNA-Ligasen ist es möglich, die Enden von DNA-Doppelsträngen zu verbinden, wodurch die Klonierung von DNA-„Inserts“ in einen zuvor linearisierten Vektor ermöglicht wird. Dabei werden unter ATP-Verbrauch Esterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe des einen Stranges und einer freien 3'-Hydroxylgruppe der Desoxyribose des anderen Stranges gebildet. Zum Einsatz kam die ATP-abhängige T4 DNA-Ligase des Phagen T4 (APPLICHEM).

Zur Ligation von Insert- und Vektor-DNA wurden standardmäßig Ansätze nach folgender Zusammensetzung hergestellt:

Vektor-DNA	7 µl
Insert-DNA	10 µl
10x Reaktionspuffer	2 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl

Die Ligation erfolgte für 2 h bei 20 °C. Gegebenenfalls wurde das Verhältnis von Vektor- zu Insertmenge variiert.

2.17 Transformationsmethoden

2.17.1 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Durchführung einer Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation verlangt den Einsatz kompetenter Zellen. Diese Zellen sind in der Lage, Plasmid-DNA im Rahmen einer Elektroporation aufzunehmen (Calvin & Hanawalt 1988, Dower *et al.* 1988). Dazu müssen die Zellen wie folgt vorbehandelt werden:

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 200 ml 1 %ig mit einer frischen ü.N.-Kultur des entsprechenden *E. coli* Stammes beimpft und bei 37 °C und 220 rpm so lange kultiviert, bis die optische Dichte bei $OD_{600} = 1,0-1,5$ lag. Die Zellen wurden 15 min auf Eis aufbewahrt und anschließend zentrifugiert (4 °C; 5 min; 10.000 rpm). Das Pellet wurde dreimal mit jeweils 100 ml kaltem, 10 %igem Glyzerin gewaschen, der Überstand nach dem letzten Waschschrift verworfen und das im Flüssigkeitsrest resuspendierte Pellet in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C; 5 min; 8.000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in der gleichen Menge 10 %igem Glyzerin resuspendiert. Zur Aufbewahrung wurden die Zellen zu je 55 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Zum Einbringen rekombinanter Plasmid-DNA in *E. coli* fand die Elektroporation als Transformationsmethode Anwendung. Dabei werden kompetente *E. coli* Zellen einem elektrischen Puls ausgesetzt, bei dem Poren in der Zellmembran entstehen, wodurch Plasmid-DNA in die Zelle eindringen kann (Calvin & Hanawalt 1988, Dower *et al.* 1988).

Im Rahmen der Elektroporation ist es nötig, den Plasmidansatz zuvor zu entsalzen, um einen Kurzschluss zu vermeiden. Hierzu wurde der Ligationsansatz vor der Elektroporation mittels Schwimmfilterdialyse (MILLIPORE, 0,025 µm Porendurchmesser) 45 min gegen 10 %iges Glycerin dialysiert.

Zur Elektroporation wurden 20 µl dialysierter DNA-Ansatz mit 55 µl kompetenten *E. coli* Zellen in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette vermischt und bei 200 Ω, 2,5 kV/cm und 25 µF im Gene Pulser II (BIORAD) elektroporiert. Nach dem elektrischen Puls wurde sofort 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zu dem Elektroporationsansatz gegeben. Die elektroporierten Zellen wurden zur Regeneration und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz maximal 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zu je 500 µl auf Ampicillin- bzw. Kanamycin-haltigen LB-Platten ausplattiert und ü. N. bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

2.17.2 Transformation von *S. cerevisiae* mittels Lithiumacetat-Methode

10x Lithiumacetat

Lithiumacetat 1 M

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

10x TE

Tris 100 mM

EDTA 10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

LiAc/TE

10x Lithiumacetat 1 Teil

10x TE 1 Teil

steriles H₂O dest. 8 Teile

50 % PEG 4000

Die Lösung wurde zur Sterilisation autoklaviert.

PEG-Lösung

10x Lithiumacetat	1 Teil
10x TE	1 Teil
50 % PEG 4000	8 Teile

Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Die Lithiumacetat-Methode basiert auf der Eigenschaft von *S. cerevisiae*, in Anwesenheit von Alkali-Kationen durch einen Hitzeschock DNA aufzunehmen. Durch Zugabe von Carrier-DNA (aus Heringssperma) erhöht sich die Transformationseffizienz um etwa das 100fache (Schiestl & Gietz 1989).

Zur Transformation wurden 2 ml einer frischen ü.N.-Kultur 5 min bei 8.000 rpm zentrifugiert und die Zellen in 1 ml sterilem H₂O dest. gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl LiAc/TE-Lösung resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl hitzedenaturierter Carrier-DNA, 2 µl Plasmid-DNA (alkalische Lyse) und 1,2 ml PEG-Lösung für 30 min bei 30 °C auf einem Rundschtüttler (220 rpm) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend einem fünfzehnminütigen Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad ausgesetzt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (20 s, 13.000 rpm) wurden die Zellen zweimal mit 750 µl 1x TE-Puffer gewaschen, in 200 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und zur Selektion auf den entsprechenden d/o-Agarplatten ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C im Brutschrank für 3-5 Tage.

2.18 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese („PAGE“) ist in der biochemischen Analytik eines der am häufigsten angewendeten Verfahren zur Trennung von Proteinen. Dabei wandern die Proteine im elektrischen Feld durch eine Polyacrylamidmatrix. Die Trennung ergibt sich aus den unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Proteine. Diese sind abhängig von der Größe, der Form und der Ladung des jeweiligen Proteins.

Eine häufig verwendete Variante der PAGE ist die von Shapiro *et al.* (1967) eingeführte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dabei erfolgt die Trennung der Proteine nur aufgrund der unterschiedlichen Molekulargewichte. Proteine werden in Anwesenheit von SDS hitzedenaturiert, wobei sich der hydrophobe Teil des SDS an hydrophobe Aminosäurereste der Proteine anlagert. Um Disulfidbrückenbindungen innerhalb eines Proteins oder Proteinkomplexes aufzubrechen, ist die Zugabe des reduzierenden Agens β-Mercaptoethanol nötig. Durch die Interaktion der Proteine mit SDS erhalten diese nahezu die gleiche (negative) Ladung. Die Wanderungstrecke im elektrischen Feld entspricht somit dem Logarithmus der Molmasse des Proteins.

Polyacrylamidgele entstehen durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und der Vernetzung der linearen Polymere durch N,N'-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisation wird durch Ammoniumperoxosulfat (APS) gestartet, wobei N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator der Reaktion dient. Durch die Konzentrationen an Acrylamid und Bisacrylamid kann die Porengröße der Gelmatrix je nach Größe der zu trennenden Proteine variiert werden.

Die von Laemmli (1970) entwickelte SDS-PAGE nutzt ein Tris-Glycin-Puffersystem und dient der Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von bis zu 100 kDa, wobei die Anwendbarkeit auf Proteine mit einem Molekulargewicht größer 15 kDa beschränkt ist. Bei der von Schägger und Jagow (1987) entwickelten Methode kommt ein Tris-Tricin-Puffersystem zum Einsatz, das sich vor allem für die Trennung von kleinen Proteinen und Peptiden unter 15 kDa eignet.

Die in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommene SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1987) wurde in einem diskontinuierlichen System durchgeführt (Disk-Elektrophorese), wodurch das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel verhindert wird und die Proteine in schärferen Banden vorliegen. Die Proben laufen dabei zuerst in ein weitporiges Sammelgel ein, was eine Fokussierung der Proteine zur Folge hat. Die Separation erfolgt anschließend in einem engporigen Trenngel.

Zur denaturierenden SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (1987) wurden, soweit nicht anders angegeben, 20 µl Probe mit dem entsprechenden Volumen an reduzierendem 4x SDS-Probenpuffer (ROTH) versetzt, für 10 min bei 100 °C inkubiert und zur Elektrophorese eingesetzt.

Tris-HCl/SDS pH8,45

Tris-HCl 3 M

SDS 0,3 % (w/v)

Der pH-Wert wurde durch Zugabe von HCl auf 8,45 eingestellt

5x Anodenpuffer

Tris-HCl 1 M

Der pH-Wert wurde durch HCl auf 8,9 eingestellt.

5x Kathodenpuffer

Tris 500 mM

Tricin 500 mM

SDS 0,5 % (w/v)

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 %ige Trenngele mit 3,8 %igen Sammelgelen in einem Tris-Tricin-Puffersystem verwendet. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 80 V für 12 min, anschließend einer Spannung von 120 V im vertikalen Elektrophoresesystem „Mini-Protean II“ (BIORAD). In Tabelle 7 sind die Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger und Jagow (1987)

Substanz	Trenngel (2 Gele)	Sammelgel (2 Gele)
Rotiphorese Gel 30	5,9 ml	1,6 ml
Tris-HCl/SDS pH 8,45	5 ml	3,1 ml
H ₂ O dest.	2,4 ml	7,8 ml
Glyzerin 79 %	2 ml	-
APS 10%	80 µl	80 µl
TEMED	25 µl	25 µl

Zur Größenbestimmung fand als Proteinlängenstandard („Marker“) der vorgefärbte „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (FERMENTAS) Verwendung, von dem je 5 µl in den Tris-Tricin-Gelen mitgeführt wurden.

An die gelelektrophoretische Auftrennung wurden nachfolgend die Proteinbanden durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht oder die Gele zum immunologischen Nachweis durch die Western-Analyse weiter bearbeitet.

2.19 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Entfärber

Methanol	30 %
Essigsäure (99,5 %)	7,5 %

Färbelösung

Coomassie-Blau R	0,1 % (w/v)
Entfärber	250 ml

Die Coomassie-Färbung dient der schnellen und einfachen Detektion von in Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteinen mit einer Sensitivität von 50-100 ng pro Proteinbande (Weiss *et al.* 2009). Der Farbstoff Coomassie bindet im sauren Milieu an basische und aromatische Seitenketten von Proteinen und färbt so unspezifisch alle

Proteine. Die Polyacrylamidmatrix des Geles wird nicht angefärbt, wodurch die Proteine nach der Entfärbung als blaue Banden im Gel sichtbar werden.

Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Gel bis zur gewünschten Farbintensität mit Färbelösung bei 20 °C auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde das Gel so lange mit Entfärbelösung behandelt, bis die Hintergrundfärbung verschwand. Die Entfärbung wurde mit H₂O dest. gestoppt.

2.20 Western-Analyse

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die Western-Analyse angewendet, bei der Proteine, die mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine PVDF-Membran fixiert werden und durch Inkubation mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden können (Burnette 1981).

2.20.1 „Semi dry blotting“

Transferpuffer

Tris	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)

Nach erfolgter PAGE wurden die Polyacrylamidgele 15-30 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert, um Salze und Detergenzien zu entfernen. Die PVDF-Membran (ROCHE) wurde kurz in 100 %igem Methanol getränkt und anschließend bis zur weiteren Verwendung in Transferpuffer aufbewahrt. Die „Whatman“-Blottingpapiere (BIORAD) wurden ebenfalls 10 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert. Das Transfersystem wurde wie folgt aufgebaut: Anode - Blottingpapier - PVDF-Membran - Polyacrylamidgel - Blottingpapier - Kathode. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die im SDS-Gel befindlichen Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode und werden damit auf die PVDF-Membran transferiert und immobilisiert.

Der Transfer wurde 1,5 h bei einer Stromstärke von 55 mA pro Gel im „Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell“-System (BIORAD) durchgeführt.

2.20.2 Immunodetektion

10x TBS

Tris	1 M
NaCl	1 M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Waschpuffer

Tris	1 M
NaCl	1 M
Tween 20	0,05 % (v/v)

„Blocking“-Puffer

Tris	1 M
NaCl	1 M
Tween 20	0,05 % (v/v)
Magermilchpulver	5 % (w/v)

Die Detektion der Proteine mittels Western-Analyse erfolgt mit zwei Antikörpern. Der erste Antikörper ist spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichtet. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 8 aufgeführt. Sekundäre Antikörper binden an die F_c-Region des jeweiligen primären Antikörpers und sind zusätzlich an ein Enzym gekoppelt, das entweder eine Farb- oder chemolumineszente Reaktion katalysiert, die detektiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit kamen sekundäre Antikörper zum Einsatz, die an das Enzym HRP (Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt waren und somit einen Nachweis von Proteinbanden unter Verwendung eines chemolumineszierenden Substrats ermöglichten. Alle sekundären Antikörper, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind ebenfalls in Tabelle 8 aufgelistet.

Zum immunologischen Nachweis wurde die PVDF-Membran mit den darauf transferierten Proteinen zunächst für 1 h bei 20 °C bzw. bei 4 °C ü. N. in Blockingpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen. Nach Dekantieren des Blockingpuffers wurde die Membran für 1 h bei 20 °C in der primären Antikörperlösung unter Taumeln belassen. Nach einmaligem Waschen mit Waschpuffer für 15-20 min bei 20 °C fand eine einstündige Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörpers bei 20 °C statt. Die genauen Angaben zu den Antikörper-Verdünnungen sind an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil aufgeführt. Nachdem die Membran erneut 3 x je 15 min bei 20 °C in Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte die Entwicklung, indem jeweils 400 µl des „Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate“ (PERKINELMER) auf die

Membran pipettiert wurde. Die Detektion der Chemolumineszenzreaktion erfolgte mit Hilfe des „ChemiDoc XRS Systems“ (BIORAD).

2.20.3 „Stripping“ und „Reprobing“

Es besteht die Möglichkeit eine bereits entwickelte PVDF-Membran derart zu behandeln, dass sie erneut bei Bedarf mit einem anderen primären Antikörper entwickelt werden kann. Dazu werden zunächst durch das sogenannte „Stripping“ alle gebundenen primären und sekundären Antikörper durch Inkubation in einer „Stripping“-Reagens von der Membran gelöst. Dazu wurde die Membran kurz mit Waschpuffer gewaschen und 15 min bei 20 °C in „Restore™ Western Blot Stripping Buffer“ (THERMO SCIENTIFIC) inkubiert. Nach 2 weiteren kurzen Waschschritten mit Waschpuffer wurde die Membran zur Überprüfung des „Strippings“ erneut mit „Western Lightning® Plus-ECL Enhanced Chemiluminescence Substrate“ (PERKINELMER) entwickelt. Waren keine Signale zu detektieren, wurde die Membran nach 2 kurzen Waschschritten erneut für 1 h bei 20 °C in Blockingpuffer inkubiert, worauf eine erneute Inkubation mit Antikörpern – das „Reprobing“ – stattfinden konnte.

2.20.4 Antikörper

In Tabelle 8 sind alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper zusammengefasst.

Tabelle 8: Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete primäre und sekundäre Antikörper. (HRP: Meerrettich-Peroxidase, FITC: Fluoresceinisothiocyanat)

Antikörper (entwickelt in)	Beschreibung	Herkunft
Anti-K28 (Kaninchen)	polyklonal	Laborkollektion
Anti-K28 α (Kaninchen)	polyklonal, gegen das C-terminale K28 α - Epitop KVISKTENAENIQS gerichtet	Laborkollektion
Anti-V5 (Maus)	monoklonal	ABD SEROTEC
Anti-DsRed (Kaninchen)	polyklonal	CLONTECH
Anti-Kaninchen IgG (Ziege)	polyklonal, HRP-gekoppelt	SIGMA
Anti-Maus IgG (Ziege)	polyklonal, HRP-gekoppelt	SIGMA
Anti-Kaninchen IgG (Ziege)	polyklonal, FITC-gekoppelt	SIGMA

2.21 Zellaufschluss

2.21.1 S80-Schnellaufschluss

Der S80-Zellaufschluss stellt eine schnelle und einfache Methode zum Aufschluss von Hefezellen und zur Gewinnung von Rohextrakten dar. Grundlage dieser Aufschlussmethode ist das schnelle Einfrieren von in H₂O dest. resuspendierten Hefezellen und anschließendem Aufkochen mit SDS-Probenpuffer. Der gewonnene Heferohextrakt wird durch Zentrifugation in Pellet- und Überstandfraktion getrennt. In ersterer befinden sich vor allem Zelldebris, letztere beinhaltet vor allem lösliche Komponenten des Zytosols und der Organellen. Die Fraktionen können daraufhin direkt mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht werden (Powilleit 2004).

Hierzu wurden Hefezellen direkt aus dem Kulturmedium 5 min bei 9.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde nach einem optionalen Waschschrift mit H₂O dest. in einer gewünschten Menge an H₂O dest. resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurden die Proben mindestens 1 h bei -80 °C gelagert. Eine längerfristige Lagerung der Proben ist an dieser Stelle möglich. Nachdem die Proben auf Eis aufgetaut wurden, erfolgte die Zugabe der entsprechenden Menge an 4 x SDS-Probenpuffer. Die Ansätze wurden zur Denaturierung 10 min bei 100 °C gekocht, wobei eine Durchmischung durch gelegentliches Vortexen erfolgte. Die Trennung der Proben in Pellet- und Überstandfraktion erfolgte durch Zentrifugation der Proben für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C. Zur SDS-PAGE wurden 20 µl des Überstandes eingesetzt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

2.21.2 Glasperlenaufschluss von Hefezellen

Proteaseinhibitor-Stammlösung

cOmplete, EDTA-free 1 Tablette

Protease Inhibitor

Cocktail Tablets (ROCHE)

Die Tablette wurde in 2 ml H₂O dest. gelöst und bei -20 °C gelagert.

1 M MOPS

MOPS pH 6,8 1 M

Die Lösung wurde sterilfiltriert.

SUMEB-Puffer

SDS	1 % (w/v)
Harnstoff	8 M
MOPS pH 6,8	10 mM
EDTA	10 mM
Bromphenolblau	0,01 % (v/v)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 M

Der Puffer wurde autoklaviert und anschließend mit einer MOPS-Stammlösung komplettiert.

Eine weitere Methode zum Aufschluss von Hefezellen, die in der vorliegenden Arbeit Anwendung fand, beruht auf einem Protokoll von Gardner *et al.* (1998). Die Hefezellen werden dabei durch den Einsatz von Glasperlen und Detergenzien aufgeschlossen.

Hefezellen wurden entweder direkt aus dem Kulturmedium oder nach Toxininkubation in Inkubationspuffer durch Zentrifugation (5 min; 9.000 rpm) geerntet und optional mit H₂O dest. gewaschen. Das Pellet wurde in Abhängigkeit von der Zellzahl in der gewünschten Menge an SUMEB-Puffer resuspendiert. Zu je 100 µl SUMEB-Puffer wurde der Ansatz mit 10 µl Proteaseinhibitor-Stammlösung und 50 µl Glasperlen (Ø=0,25-0,5 mm) versetzt. Die Proben wurden bei 4 °C in einer Schwingmühle (RETSCH) bei einer maximaler Frequenz 3 x 1 min gevortext und anschließend 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß pipettiert und 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Zelldebris zu pelletieren. Der danach erhaltene Überstand wurde direkt zur SDS-PAGE eingesetzt oder zur langfristigen Lagerung bei -80 °C eingefroren.

2.22 Herstellung von ToxinkonzentratB-Medium (1 l)

Glukose	50 g
Inosit	0,04 g
Tri-Natriumcitrat	0,5 g
D, L-Äpfelsäure	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2,05 g
CaCl ₂	0,5 g
Glyzerin	15 %

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 4,7 eingestellt; Glukose wurde getrennt autoklaviert.

10x Aminosäurestammlösung (1 l)

L-Alanin	0,75 g	L-Serin	0,5 g
L-Arginin	3,5 g	L-Threonin	2,0 g
L-Asparaginsäure	0,5 g	L-Tryptophan	0,4 g
L-Glutaminsäure	3,0 g	L-Leucin	0,5 g
L-Histidin x HCl x H ₂ O	0,2 g	Uracil	0,2 g
L-Methionin	0,4 g		

Die Lösung wurde über Dampf sterilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

10x Vitaminstammlösung (1 l)

4-Aminobenzoesäure	20 mg
Nicotinsäure	100 mg
Pyridoxol-hydrochlorid	100 mg
Calcium-D-Panthenat	100 mg
Biotin	2 mg
Folsäure	2 mg
Riboflavin	50 mg

Die Lösung wurde über Dampf sterilisiert und bei -20°C aufbewahrt.

100 x Spurenelementstammlösung (1 l)

Borsäure	200 mg
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg
AlCl ₃	200 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	100 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	100 mg
Li ₂ SO ₄ x H ₂ O	100 mg
Kaliumiodid	100 mg
Kaliumhydrogentartrat	2 g

Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Produktion des Killertoxins K28 wurde der *S. cerevisiae* Stamm MS300c, bei dem das Toxin viral codiert ist, verwendet (Schmitt & Tipper 1990). Die Herstellung des K1-Killertoxinkonzentrates erfolgte analog unter Verwendung des *S. cerevisiae* Stammes T158c. Zunächst wurden zur Produktion von Toxin-haltigem Überstand zwei Vorkulturen in B-Medium pH 4,7 (20 ml und 200 ml, jeweils ü. N. bei 30 °C und 220 rpm) hergestellt. Die Hauptkultur (10 l B-Medium pH 4,7) wurde mit der zweiten Vorkultur beimpft und vier Tage bei 20 °C unter

leichtem Rühren kultiviert. Zur Gewinnung des Toxin-haltigen Überstandes wurde die Zellmasse zentrifugiert (9.000 rpm, 10 min) und verworfen. Die Aufkonzentrierung des zellfreien Überstandes erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde das Volumen mittels Querstromfiltration auf etwa 500 ml verringert. Dazu wurde der Überstand mit Hilfe einer „Watson Marlow 6035“-Pumpe bei 4 °C und einem Druck von 1 bar über das Tangentialflusssystem 17521-001 (SARTORIUS) geleitet. Als Membran fand eine Polyethersulfon-Membran (SARTORIUS) mit einer Ausschlussgrenze von 8 kDa Anwendung. Der auf diese Weise etwa 20fach konzentrierte Überstand wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min, 7.000 rpm) um feste, ungelöste Bestandteile zu entfernen. Um eine noch höhere Konzentration zu erreichen, wurde das Retentat mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle (AMICON®) über eine Filtermembran aus regenerierter Zellulose mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (MILLIPORE) unter einem N₂-Atmosphärendruck von 3 bar weiter eingeeengt, bis ein Restvolumen von etwa 100 ml und somit eine etwa 100fache Toxinkonzentration erreicht wurde. Zur Bestimmung der Aktivität des Toxinkonzentrates wurde dieses im MBA (siehe Punkt 2.23) gegen einen sensitiven *S. cerevisiae* Stamm getestet. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C in 2 ml-Aliquots, wodurch häufiges Auftauen und erneutes Einfrieren vermieden wurde.

2.23 Methylenblau-Agardiffusionstest (MBA)

Minimal-MBA bzw. „Drop-out“-MBA (0,5 l)

Lösung A:

SC- bzw. d/o-Mix	0,85 g
(siehe Punkt 2.5.2)	
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Zitronensäure	9 g
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	17 g
Methylenblau	0,015 g
H ₂ O dest.	ad 0,25 l

Der pH-Wert wurde vor der Zugabe von Methylenblau mit K₂HPO₄ auf 4,7 eingestellt.

Lösung B:

“YNB w/o aminoacids and ammonium sulphate”	0,85 g
H ₂ O dest.	ad 0,05 l

Lösung C:

Glukose	10 g
(Galaktose	15 g)
Agar	14 g
H ₂ O dest.	ad 0,2 l

Die Lösungen A und C wurden getrennt autoklaviert; Lösung B wurde sterilfiltriert. Nach Abkühlen der Lösungen A und B auf etwa 50 °C wurden diese mit Lösung C vereinigt und zu je 15 ml auf sterile Reagenzgläser verteilt.

Die Sensitivität verschiedener *S. cerevisiae* Stämme gegenüber den Killertoxinen K28 und K1 wurde mit Hilfe des Methylenblau-Agardiffusionstests bestimmt. Dazu wurden jeweils 1×10^6 Zellen des zu testenden Stammes in flüssigen, auf 48 °C abgekühlten Methylenblau-Agar gegeben und dieser in eine sterile Petrischale verteilt. Nach Aushärtung des Agars wurde mit Hilfe eines Korkbohrers ein Loch ($\varnothing \sim 1$ cm) in den Agar gestanzt und dieses mit jeweils 100 μ l des entsprechenden Toxinkonzentrates befüllt. Dabei diffundiert das Toxin in den Agar, wobei die Konzentration vom Mittelpunkt zur Peripherie logarithmisch abnimmt. Die Kultivierung der MBA-Platten erfolgte für 3 bis 5 Tage bei 20 °C. Bei sensitiven Hefestämmen bewirkt das Toxin eine Wachstumsinhibition, was zur Ausbildung eines Hemmhofs führt. Am Rand des Hemmhofs befindliche abgestorbene Zellen nehmen das Methylenblau aus dem Agar auf und färben die Hemmhofgrenze dunkelblau. Der Durchmesser des Hemmhofs wurde gemessen (3fache Bestimmung) und ist ein qualitatives Maß für die Sensitivität eines Hefestammes gegenüber einem Killertoxin.

2.24 Sphäroplastierung

DTT-Stammlösung

DTT 1 M

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Sphäroplastierungspuffer

Sorbit 0,8 M

Tris-HCl, pH 7,5 10 mM

CaCl₂ 10 mM

Der Puffer wurde autoklaviert. Vor direktem Gebrauch wurde eine 1 M DTT-Stammlösung in einer Endkonzentration von 2 mM, sowie 200 μ g/ml Zymolyase 20T zugegeben.

Eine logarithmisch wachsende Hefekultur des betreffenden Stammes mit einer Zellzahl von etwa 1×10^7 Zellen/ml wurde durch Zentrifugation (9.000 rpm, 5 min) geerntet und mit H₂O dest. gewaschen. Das Nassgewicht des Zellpellets wurde ermittelt und die Zellen in 100 ml Sphäroplastierungspuffer pro 1 g Nassgewicht resuspendiert. Die Sphäroplastierung der Zellen erfolgte für 90 min bei 30 °C auf einem Schüttler (90 rpm). Der Erfolg der Sphäroplastierung wurde lichtmikroskopisch unter Zugabe von 10 % SDS überprüft. Sphäroplastierte Hefezellen haben eine rundliche Form und zerplatzen nach Zugabe der Detergenzlösung. Da Sphäroplasten empfindlich sind, wurden alle folgenden Zentrifugationsschritte bei 2.000 rpm durchgeführt (Zhu & Bussey 1989).

2.25 Toxininkubation

Citrat-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (pH 4,7)

Lösung A:

Zitronensäure-Monohydrat	21,01 g
H ₂ O dest.	ad 1,0 l

Lösung B:

N ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	35,6 g
H ₂ O dest.	ad 1,0 l

Zur Herstellung einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 4,7 wurden 48 ml von Stammlösung A mit 52 ml von Stammlösung B vermischt.

Inkubationspuffer

Lösung A:

(Sorbit	0,8 M)
Tris	10 mM
Glukose	10 mM
Citrat-Phosphat-Puffer pH 4,7	10 %

Lösung B:

CaCl ₂	10 mM
-------------------	-------

Lösung A wurde autoklaviert; Lösung B wurde sterilfiltriert. Beide Lösungen wurden nach der Sterilisation vereinigt.

Osmotisch stabilisiertes Toxinkonzentrat

Sorbit 0,8 M

Die entsprechende Menge an Sorbit wurde in 100fach konzentriertem Toxinkonzentrat (siehe Punkt 2.22) gelöst.

Zur Toxininkubation von Hefezellen wurde die gewünschte Menge einer Kultur zentrifugiert (9.000 rpm, 5 min), einmal mit H₂O dest. gewaschen und in Inkubationspuffer aufgenommen. Sphäroplastierte Hefezellen wurden einmal in sorbithaltigem Inkubationspuffer gewaschen (2.000 rpm, 5 min) und danach in diesem aufgenommen.

Generell wurde den Ansätzen 100faches Toxinkonzentrat in einer Endkonzentration von 10 % zugefügt. Für die Behandlung von Sphäroplasten wurde osmotisch stabilisiertes Toxinkonzentrat verwendet. Die genauen Volumina und Toxininkubationszeiten richteten sich nach dem jeweiligen Versuch und werden explizit an ansprechender Stelle im Ergebnisteil genannt.

2.26 Serieller Verdünnungstest

Um die *in vivo* Toxizität intrazellulär exprimierter K28 α -Varianten zu untersuchen, wurde ein serieller Verdünnungsassay durchgeführt. Die K28 α -Varianten standen dabei alle unter der Kontrolle des P_{GAL1} - bzw. P_{GAL10} -Promotors. Der entsprechende *S. cerevisiae* Stamm wurde in d/o-Medium mit Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle ü. N. bei 30 °C auf einem Schüttelinkubator (220 rpm) kultiviert. Die Zellzahl der Kultur wurde bestimmt und ein Volumen, das 1×10^7 Zellen enthielt, zentrifugiert (9.000 rpm, 5 min). Das Pellet wurde in 50 μ l d/o-Raffinose-Medium resuspendiert und fünf Verdünnungsstufen (10^7 bis 10^2) mit d/o-Raffinose-Medium erstellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 5 μ l auf eine d/o-Glukose-Agarplatte (reprimierende Bedingungen) und auf eine d/o-Galaktose-Agarplatte (induzierende Bedingungen) getropft. Die Platten wurden fünf Tage bei 30 °C kultiviert. Über das Wachstum der einzelnen Verdünnungsstufen kann eine qualitative Aussage über die Toxizität der intrazellulär exprimierten K28 α -Variante getroffen werden.

2.27 Immunogold-Elektronenmikroskopie (IEM)

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen in Verbindung mit einer Immunogold-färbung bieten die Möglichkeit, die exakte Lokalisation von Proteinen innerhalb einer Zelle zu bestimmen. Dabei werden von den zu untersuchenden Zellen nach deren Fixierung Ultradünnschnitte angefertigt, die mit einem entsprechenden primären Antikörper behandelt werden. Zur Detektion des primären Antikörpers werden entweder sekundäre, mit Goldpartikeln gekoppelte Antikörper oder Protein A-gekoppelte Goldpartikel verwendet. Die Goldpartikel sind später auf den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen als Punkte zu erkennen und zeigen so den genauen Ort des Proteins innerhalb der Zelle (Binder *et al.* 1996, Griffith *et al.* 2008, Griffith & Reggiori 2009).

Die Präparation von Hefezellen zur IEM erfordert neben den entsprechenden Gerätschaften ein hohes technisches Können und langjährige Erfahrung. Die Versuche zur IEM an Hefezellen wurden daher am „Department of Cell Biology and Institute of Biomembranes“ des „University Medical Centre“ in Utrecht, Niederlande in der Arbeitsgruppe von Fulvio Reggiori (Assistant Professor of Cell Biology) durchgeführt.

Fixierung

PHEM-Puffer pH 6,9

PIPES	120 mM
HEPES	50 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	4 mM
EGTA	20 mM

Zur Herstellung von 100 ml PHEM-Puffer wurden zunächst 3 NaOH-Pellets in 75 ml H₂O dest. gelöst. Es folgte die Zugabe von 3,63 g PIPES, was zu einem pH-Wert von etwa 7 führen sollte. Die restlichen Bestandteile wurden hinzugefügt und der pH-Wert durch 1 M NaOH auf 6,9 eingestellt. Das Volumen wurde mit H₂O dest. auf 100 ml aufgefüllt.

2 x Fixativ

para-Formaldehyd	4 %
Glutaraldehyd	0,4 %
PHEM-Puffer pH 6,9	0,1 M

Eine 16 %ige Stammlösung para-Formaldehyd wurde bei -20 °C gelagert, eine 8 %ige Stammlösung Glutaraldehyd wurde bei 4 °C gelagert.

2,3 M Sucrose/PHEM

Sucrose 2,3 M
gelöst in 1x PHEM-Puffer pH 6,9

“Pick-up“-Lösung

Methyl-Cellulose 1 %
Sucrose 1,15 M

Zur Fixierung von Hefezellen zur IEM wurden 10 ml einer Hefekultur mit dem gleichen Volumen an 2 x Fixativ vermengt und 20 min bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (1.000 rpm, 7 min), das Pellet in 10 ml 1x Fixativ resuspendiert und erneut für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1.000 rpm, 7 min) wurden die Zellen in 1 ml PHEM-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml-Gefäß überführt.

Gelatine-Einbettung

Die fixierten Zellen wurden zunächst dreimal mit je 1 ml 1x PHEM-Puffer gewaschen. Zum Pelletieren wurden die Zellen zwischen den Waschschritten für wenige Sekunden zentrifugiert. Zum Destabilisieren der Zellwand wurden die Zuckerbestandteile durch Periodsäure gespalten. Dieser Schritt ist notwendig, da bei der anschließenden Anfertigung der Kryoschnitte eine feste Zellwand zerreißen und somit die Ultrastruktur der Hefezellen zerstört würde. Dazu wurden die Zellen in 1 % Periodsäure (in 1x PHEM-Puffer) resuspendiert und der Ansatz 1 h bei Raumtemperatur auf einem Roller inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit je 1 ml 1x PHEM-Puffer gewaschen, die Restflüssigkeit sorgfältig entfernt und die Zellen in 12 % Gelatine (in 1x PHEM-Puffer) aufgenommen. Nach einer fünf- bis zehnminütigen Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz zum Aushärten der Gelatine auf Eis abgekühlt. Aus der erhärteten Gelatine wurden Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 0,5 mm ausgeschnitten und diese ü. N. bei 4 °C in 2,3 M Sucrose/PHEM-Puffer auf einem Schüttler inkubiert. Die Blöcke wurden auf Metallpins aufgebracht, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verwendung in diesem gelagert.

Trimmen und Schneiden

Das Trimmen und Schneiden der Gelatine-Blöcke wurde an dem Tieftemperatur-Ultramikrotom EM FCS (LEICA) mit einem Glasmesser bzw. Diamantmesser durchgeführt. Zum Trimmen wurde die Schneideapparatur durch flüssigen Stickstoff auf -100 °C gekühlt; die Anfertigung der Ultradünnschnitte erfolgte bei -120 °C. Eine Auswahl an Schnitten wurde

mit Hilfe einer Öse, die in „Pick-up“-Lösung getränkt war, vom Messer abgenommen und auf ein Kupfer-„Grid“ aufgebracht.

Immunolabeling (nach Slot *et al.* 1991)

0,2 % Glycin

Glycin	0,075 mg
1x PBS	50 ml

20 % Na-Azid

Na-Azid	2 g
H ₂ O dest.	10 ml

10 % BSA

BSA	10 g
20 % Na-Azid	100 µl
H ₂ O dest.	ad 100 ml

10 g BSA wurden in 60 ml H₂O dest. gelöst und ü. N. bei 4 °C gerührt. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt und 100 µl Na-Azid hinzugefügt. Das Volumen wurde mit H₂O dest. auf 100 ml aufgefüllt und der Ansatz 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in kleinen Aliquots bei 4 °C gelagert.

1 % BSA

BSA 10 %	0,5 ml
1x PBS	5 ml

0,1 % BSA, 0,5 % „Fish Skin Gelatine (FSG)“

BSA 10 %	0,5 ml
FSG 5 %	0,5 ml
1x PBS	5 ml

1 % Glutaraldehyd

Glutaraldehyd 8 %	0,5 ml
1x PBS	3,5 ml

Uranylacetat-Stammlösung

Uranylacetat 6 %

20 ml einer 6 %igen Uranylacetat-Lösung wurden in H₂O dest. gelöst und 2 h bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt. Der Ansatz wurde filtriert.

Methylcellulose-Stammlösung

Methylcellulose 4 g

25 centipoints

H₂O dest. 196 ml

196 ml H₂O dest. wurden auf 90 °C erhitzt. Nach der Zugabe von 4 g Methylcellulose wurde der Ansatz unter Rühren in einem Eisbad auf eine Temperatur von 10 °C abgekühlt. Das Gefäß wurde mit Parafilm verschlossen und die Lösung bei 4 °C ü. N. gerührt. Der Überstand konnte nach dreitägiger Lagerung bei 4 °C verwendet werden.

Uranylacetat-Methylcellulose-Lösung (1:9)

Uranylacetat-Stammlösung 4 ml

Methylcellulose-Stammlösung 36 ml

Die Lösung wurde bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die mit Ultradünnschnitten behafteten Kupfer-„Grids“ wurden in eine Petrischale mit 2 %iger Gelatine überführt. In einer feuchten Kammer wurde die Gelatine zunächst durch zehninütige Bestrahlung mit einer Wärmelampe zum Schmelzen gebracht und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die nachfolgenden Schritte wurden durch Auftropfen der jeweiligen Lösung auf die Kupfer-„Grids“ durchgeführt. Zunächst wurden die „Grids“ einmal mit 0,2 % Glycin (1 min) und viermal mit 0,2 % Glycin (2 min) gewaschen. Das „Blocken“ erfolgte für 3 min mit 1 % BSA. Zur Immunfärbung wurde zunächst der primäre Antikörper in der entsprechenden Konzentration in 0,1 % BSA, 0,5 % FSG gelöst. Die „Grids“ wurden 60 min mit 5-10 µl der primären Antikörperlösung inkubiert und anschließend einmal mit 1x PBS (1 min) und viermal mit 1x PBS (2 min) gewaschen. Die Detektion der primären Antikörper erfolgte durch Inkubation der „Grids“ in 5-10 µl Protein A-Gold-Pufferlösung (1x PBS, 1 % BSA) für 20 min. Zum Waschen der „Grids“ wurden diese anschließend einmal in 1x PBS (1 min) und viermal in 1x PBS (2 min) belassen.

Zur Fixierung der „Grids“ wurden diese in einen Tropfen aus 1x PBS, 1 % Glutaraldehyd überführt und 5 min inkubiert. Die „Grids“ wurden anschließend sechsmal 1 min mit H₂O dest. gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte durch Uranylacetat. Dazu wurden die „Grids“ zunächst 10 min mit Uranylacetat pH 7,0 inkubiert und kurz mit H₂O dest. sowie kurz mit

Uranylacetat-Methylcellulose pH 4,0 gewaschen. Die Färbung erfolgte durch zehnmütige Inkubation mit Uranylacetat-Methylcellulose pH 4,0 auf Eis. Die „Grids“ wurden zum Trocknen mit Hilfe einer Öse auf Whatman-Filterpapier überführt und 30 min bei RT gelagert. Die auf diese Art präparierten „Grids“ wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop JEM-1010 (JEOL) untersucht.

2.28 Fluoreszenzmikroskopische Methoden

2.28.1 Fluoreszenzmikroskopie

Als spezielle Form der Lichtmikroskopie bietet die Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit, fluoreszierende Moleküle, sogenannte Fluorochrome, mikroskopisch zu detektieren. Bei Anregung eines Fluorochroms mit Licht einer definierten Wellenlänge werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Bei der Rückkehr auf das ursprüngliche Energieniveau wird ein Teil der aufgenommenen Energie als Emissionslicht abgestrahlt. Dabei ist das emittierte Licht stets energieärmer und besitzt daher eine größere Wellenlänge als das Anregungslicht („Stokes-Shift“).

Die Aussendung des Anregungslichts erfolgt bei Fluoreszenzmikroskopen durch eine Quecksilberdampfampe. Mit Hilfe von speziellen Erregungsfiltern wird gewährleistet, dass die Probe nur mit Licht einer definierten Wellenlänge bestrahlt wird. Die Trennung von Anregungs- und Emissionslicht erfolgt durch weitere optische Filter.

Die fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten wurden am Epifluoreszenzmikroskop „Biozero BZ-8000“ (KEYENCE) mit dem Ölimmersionsobjektiv PlanApo, VC, 100x, NA: 1.40 (NIKON) durchgeführt. Die dabei verwendeten Filter sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Bearbeitung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgte mit Hilfe des Programms „BZ Analyzer“ (KEYENCE).

Tabelle 9: Die am Fluoreszenzmikroskop "Biozero BZ-8000" verwendeten Filtersets.

Filter Anregung [nm]	Filter Emission [nm]	Dichroischer Spiegel [nm]	Fluorochrom
480/30	510-	505	FITC
560/40	630/60	595	mRFP, mCherry

2.28.2 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF)

Fixativ

2 g Paraformaldehyd wurden in 50 ml H₂O dest. unter Erhitzen gelöst. Nach der Zugabe von 350 µl 6 M NaOH wurde der Ansatz bis zum Aufklaren gerührt. Nach Abkühlung wurden 0,68 g KH₂PO₄ und 50 µl 1 M MgCl₂ zugegeben. Die Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

TEB-Puffer

Tris-HCl pH 8,0	200 mM
EDTA	20 mM
β-Mercaptoethanol	1 %

β-Mercaptoethanol wurde stets vor Gebrauch zugegeben.

SPM-Puffer

Sorbit	1,2 M
KH ₂ PO ₄	50 mM
MgCl ₂	1 mM

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 7,3 eingestellt.

Sorbit

Sorbit	1,2 M
--------	-------

Sorbit-SDS

Sorbit	1,2 M
SDS	4 %

PBS-BSA

BSA	5 mg/ml
-----	---------

Der Puffer wurde kurz vor Gebrauch in 1x PBS angesetzt.

„Mounting-Medium“

Glyzerin 100 %	4,5 ml
p-Phenylendiamin (10 mg/ml in 1x PBS, pH 9,0)	500 µl
DAPI (1 mg/ml in H ₂ O dest.)	0,1 µl
H ₂ O dest.	ad 5 ml

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

Zur indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Roberts *et al.* (1991) angewendet. Um intrazelluläre Epitope für den primären Antikörper zugänglich zu machen, werden dabei die Hefezellen nach deren Fixierung sphäroplastiert und die Membranen durch leichte Detergenzbehandlung permeabilisiert.

Fixierung

Für die IIF wurden sowohl Hefezellen in Kultur, als auch toxinbehandelte Zellen verwendet. 10 ml der Hefesuspension wurden zur Fixierung zunächst mit 1,2 ml 37 % Formaldehyd versetzt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (8.000 rpm, 5 min) und das Pellet in 2 ml Fixativ aufgenommen. Die Fixierung erfolgte unter leichtem Schütteln bei 30 °C ü. N. (max. 16 h). Die fixierten Zellen wurden pelletiert (8.000 rpm, 5 min), in 1 ml TEB-Puffer aufgenommen und 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (8.000 rpm, 5 min) wurden die Zellen in 1 ml SPM-Puffer aufgenommen und durch Zugabe von 25 µl Glusulase (ROCHE) sowie 15 µl Zymolyase 20T (100 mg/ml in SPM) für 60 min bei 30 °C sphäroplastiert. Die fixierten und sphäroplastierten Zellen wurden zentrifugiert (2.000 rpm, 5 min) und mit 1 ml 1,2 M Sorbit gewaschen. Das Pellet wurde in 500 µl 1,2 M Sorbit resuspendiert, 500 µl Sorbit-SDS zugegeben und der Ansatz 2 min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2.000 rpm, 5 min) wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml 1,2 M Sorbit gewaschen und schließlich in 1 ml 1,2 M Sorbit resuspendiert.

Immunfärbung

Die Immunfärbung der präparierten Zellen erfolgte direkt auf Objektträgern. Dazu wurden 40 µl der Zellen auf einen Poly-Lysin-bedeckten Objektträger (MENZEL) aufgebracht und zum Absetzen der Zellen mind. 10 min inkubiert. Die Restflüssigkeit wurde mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette abgenommen und die Zellen dreimal mit 40 µl PBS-BSA gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 40 µl PBS-BSA bei RT für 30 min in einer feuchten Kammer. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und 40 µl primäre Antikörperlösung aufgetropft. Die genauen Verdünnungen variierten und sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil genannt. Die Zellen wurden 60 min bei RT in einer feuchten Kammer mit primärem Antikörper inkubiert und anschließend sechsmal mit jeweils 40 µl PBS-BSA gewaschen. Es folgte eine sechzigminütige Inkubation mit 40 µl sekundärer Antikörperlösung (FITC-markiert, 1:1000, in PBS-BSA) in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden neunmal mit PBS-BSA gewaschen, die Restflüssigkeit sorgfältig entfernt und ein kleiner Tropfen „Mounting-Medium“ aufpipettiert. Nach Auflegen eines Deckglases wurden die Zellen direkt mikroskopiert (siehe Punkt 2.28.1).

2.28.3 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalyse (BiFC)

Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation ist ein Verfahren zum *in vivo* Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine mit jeweils einem nicht-fluoreszierenden Teil eines Fluoreszenzproteins fusioniert. Kommt es bei einer Koexpression innerhalb der Zelle zur Interaktion beider Proteine, wird das Fluoreszenzprotein rekonstituiert und kann mikroskopisch detektiert werden (Hu *et al.* 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde ein BiFC-System mit dem Fluoreszenzprotein mCherry genutzt. Das 234 AS große Protein war dabei zwischen den AS 159 und 160 in die beiden Fragmente MN und MC geteilt, die über die Linkersequenz GGGGSGGGGS an das entsprechende Fänger- bzw. Beuteprotein fusioniert wurden (Fan *et al.* 2008, Schäuble 2008). Als Positivkontrolle diente das Hsp40-Cochaperon Sis1p, welches Homodimere bildet und bereits erfolgreich im Hefe-BiFC-System verwendet wurde (Sha *et al.* 2000, Sung & Huh 2007, Schäuble 2008)

2.29 RNA-Seq

2.29.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae* wurde das „RNeasy Midi Kit (QIAGEN) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll I. des „RNeasy Midi Kit“ Handbuchs (09/2010) zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Hefe.

Das Prinzip des „Kits“ beruht auf der selektiven Bindung von RNA an eine Säulenmatrix. Nach Zellaufschluss wird der wässrige Überstand des Zellhomogenisats mit dem gleichen Volumen 70 % Ethanol versetzt und auf eine „RNeasy Midi“-Säule gegeben. Die Löslichkeit der RNA wird durch das Ethanol und dem zum Einsatz kommenden Hochsalzpuffer soweit herabgesetzt, dass sie präzipitiert und an die Silikamembran bindet. Dabei binden ausschließlich RNA-Moleküle mit einer Länge von mindestens 200 nt. Kleinere rRNA-Moleküle sowie alle tRNAs werden somit entfernt. Nach Bindung der RNA an die Säule fand ein Verdau der noch vorhandenen DNA durch das „RNase-free DNase Set“ (QIAGEN) nach Herstellerangaben („RNeasy Midi Kit“ Handbuch, 09/2010) statt. Nach weiteren Waschschritten wurde die RNA in 250 µl RNase-freiem H₂O eluiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.29.2 Überprüfung der RNA-Qualität und -Konzentration

Die Bestimmung der Qualität, Reinheit und Konzentration der RNA-Proben erfolgte mit Hilfe des „Agilent 2100 Bioanalyzers“ (AGILENT). Dazu wurden die Proben zunächst mit dem „Agilent RNA 6000 Nano Kit“ (AGILENT) laut Herstellerangaben vorbereitet und auf den Chip geladen. Die Proben wurden anschließend im „Bioanalyzer“ elektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 6 ist exemplarisch das Elektropherogramm einer Probe gezeigt.

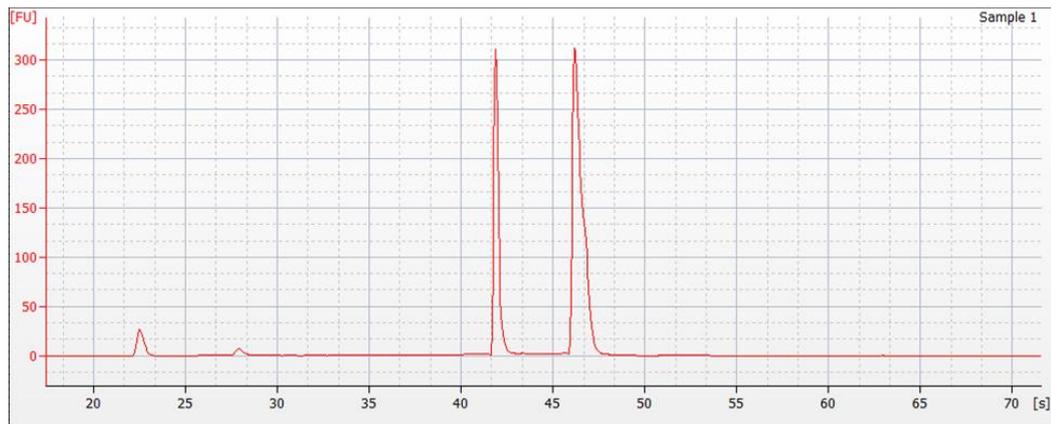


Abbildung 6: Agilent Bioanalyzer Elektropherogramm. Exemplarische Darstellung eines Elektropherogramms zur Beurteilung der RNA-Qualität einer im Rahmen der Arbeit hergestellten RNA-Probe. Im Agilent Bioanalyzer wird die RNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Sensor detektiert die fluoreszierende RNA. Gezeigt ist die Fluoreszenzintensität im Zeitverlauf. Die „Peaks“ entsprechen der ribosomalen RNA (5S; 5,8S; 18S; 25S).

2.29.3 Probenvorbereitung, Sequenzierung, Auswertung

Die Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq ist eine komplexe Methode, bei der die Gesamtzahl aller in einer Probe vorhandener Transkripte sequenziert wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine Transkriptomanalyse von K28-behandelten Hefezellen durchgeführt werden, um einen Überblick zu erhalten, welche Gene durch K28 hoch- bzw. herunterreguliert werden. Verwendet wurde hierfür der BY4742-Stamm pYES2.1-präpro α , der das Letalkonstrukt präpro α unter Galaktoseinduktion exprimiert. Als Kontrolle wurde der Stamm BY4742 mit dem Leervektor pYES2.1-leer mitgeführt. Beide Stämme wurden ü. N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert und die Expression durch Überführung in Ura d/o Galaktose-Medium induziert. Nach bestimmten Zeitpunkten (0 h, 2 h, 7 h) wurden jeweils 2×10^8 Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die Überprüfung der RNA-Qualität, sowie die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte am „Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland“ (HIPS).

Aus den Gesamt-RNA-Proben wurde zunächst die vorhandene mRNA aufgereinigt und diese mit Hilfe des „ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit“ über Random Hexamer-Primer in cDNA umgeschrieben. Nach einer enzymatischen Fragmentierung auf eine Größe von etwa 200 bp wurden die für die Sequenzierung nötigen Adapter an die cDNA-Fragmente ligiert. Die Sequenzierung erfolgte in 5'→3'-Richtung mit dem Illumina-System. Die dabei generierten „reads“ hatten eine Länge von 51 nt. Das „mapping“ der einzelnen „reads“ zum Referenzgenom erfolgte mit der frei zugänglichen Software „TopHat“, für die Berechnung der Expressionsstärke der einzelnen Gene wurde das Programm „Cufflinks“ genutzt (Trapnell *et al.* 2010, Trapnell *et al.* 2012). Als Maß für die Expressionsstärke eines Gens diente der RPKM-Wert („reads per kilobase of transcript per million mapped reads“). Dabei ist die Anzahl der erhaltenen „reads“ eines Transkriptes über die Transkriptlänge und die Gesamtanzahl an „reads“ in der gleichen Probe normiert (Mortazavi *et al.* 2008).

Zur statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wurden diese mit der frei zugänglichen Softwareanwendung SAM („Significance analysis of microarrays“) analysiert. Mit dieser lässt sich bestimmen, ob die Hoch- oder Herunterregulation eines Gens statistisch signifikant ist (Tusher *et al.* 2001).

2.30 Chemikalien, Enzyme und „Kits“

Tabelle 10 zeigt die wichtigsten, im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Arbeitsmaterialien. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von MERCK, Darmstadt oder ROTH, Karlsruhe bezogen.

Tabelle 10: Auflistung der wichtigsten Chemikalien, Enzyme, "Kits", und weiteren Labormaterialien

Firma	Produkte
Materialien und Chemikalien	
APPLICHEM, Darmstadt	X-Gal, T4 DNA-Ligase, IPTG, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
BIOLINE, Luckenwalde	HyperLadder
BIORAD, München	Elektroporationsküvetten, Whatman-Blotting-Papier
BIOZYM, Oldendorf	Agarose
DIFCO, Detroit (USA)	YNB w/o amino acids and ammonium sulfate
FERMENTAS, St. Leon-Rot	RNAse A, dNTPs, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Restriktionsenzyme
FORMEDIUM, Norfolk (GB)	Galaktose
MARCOR, New Jersey (USA)	Agar, Pepton, Hefeextrakt
MILLIPORE, Eschborn	Dialysefilter
NALGENE CRYOWARE, Rochester (USA)	Kryoröhrchen
NEB (USA)	Phusion High Fidelity Taq Polymerase
NUNC, Rochester (USA)	96-well-Mikrotiterplatten
PERKIN ELMER, Waltham (USA)	Western Lightning Plus-ECL
ROCHE, Basel (Schweiz)	Restriktionsenzyme, Expand™ High Fidelity PCR System, FastStart High Fidelity PCR System, Complete Protease-Inhibitor Cocktail, PVDF-Membran
SARTORIUS, Göttingen	Minisart Spritzenvorsatzfilter
SERVA, Heidelberg	β-Mercaptoethanol, Triton X-100, DMSO
SIGMA, Deisenhofen	Acrylamid, Heringssperma-DNA, Taq-DNA-Polymerase, Ampicillin, TEMED
„Kits“	
ANALYTIK JENA, Jena	innuPREP Plasmid Mini Kit
INVITROGEN, Karlsruhe	pYES2.1 TOPO TA Expression Kit
NOVAGEN, Darmstadt	pSTBlue-1 Acceptor Kit
OMEGA BIO-TEK, Norcross USA)	E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit
QIAGEN, Hilden	RNeasy® Midi Kit

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Themengebiete. Zum einen sollte der Nukleus von *S. cerevisiae* als terminaler Wirkungsort des K28 α -Toxins verifiziert werden, zum anderen bestand das Ziel darin, den molekularen Mechanismus von K28 α auf den Zellzyklus von *S. cerevisiae* näher zu charakterisieren. Beide Aufgabenstellungen wurden bereits von Reiter (2004) ausführlich bearbeitet, wodurch wertvolle und wichtige Erkenntnisse bezüglich Kernimport und Wirkmechanismus von K28 α gewonnen werden konnten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen knüpfen daher unmittelbar an die Daten der Dissertation von Reiter (2004) an.

3.1 Untersuchungen zur Kernlokalisierung von K28 α

Das viral kodierte Killertoxin K28 gelangt nach Bindung an die Zellwand sensitiver *S. cerevisiae* Zellen und Translokation zur Plasmamembran über Endozytose in das Zellinnere. Durch Bindung an den HDEL-Rezeptor Erd2p durchläuft es retrograd den Sekretionsweg über Golgi-Apparat und ER, von wo aus es vermutlich über den Sec61-Komplex in das Zytoplasma retrotransloziert (Kelkel 2009, Gießelmann 2011). Die Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit wird getrennt und K28 β proteasomal degradiert. Die zytotoxische α -Untereinheit von K28 kann ihre letale Wirkung entfalten, was sich in einem Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase und einer irreversiblen Hemmung der DNA-Synthese äußert (Schmitt & Breinig 2006). Da die Regulation des Zellzyklus und die DNA-Replikation im Nukleus stattfinden, liegt die Vermutung nahe, dass der Nukleus auch den terminalen Wirkungsort von K28 α darstellt.

Reiter (2004) nutzte bereits ein breites Methodenspektrum zur Bestimmung der Lokalisation von K28 α . Zum direkten Nachweis von K28 α im Hefezellkern wurden Zellkernpräparationen Toxin-behandelter Zellen angefertigt und diese mittels Western-Analyse untersucht. Dabei konnten weder wildtypisches K28 α noch HA-„getaggte“ K28 α -Varianten nachgewiesen werden (Reiter 2004). Ein Ansatz zum indirekten Nachweis des Kernimports von K28 α bestand im Anfügen der Kernlokalisationssequenz des SV40 T-Antigens an dessen N-terminales Ende und die intrazelluläre Expression der NLS-K28 α -Variante. Findet die toxische Wirkung im Nukleus statt, sollten K28 α -Varianten mit einer zusätzlichen NLS-Sequenz forciert in den Nukleus importiert werden und im Vergleich zu wildtypischem K28 eine erhöhte toxische Wirkung auf sensitive Hefezellen zeigen. In Wachstumsuntersuchungen konnte eine gesteigerte Toxizität des Konstrukts prä-NLS-TEV-K28 α^R

nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten auch Zellen, die NLS-K28 α -Varianten ohne prä-Sequenz exprimierten, einen Selbstkillerphänotyp (Reiter 2004, Sendzik 2006). Des Weiteren wurde von Reiter die K28-Sensitivität von *S. cerevisiae* Mutanten mit Deletionen in Genen von Kernporenproteinen überprüft. Fünf Mutanten zeigten dabei eine veränderte Sensitivität gegenüber K28 im Vergleich zum isogenen Wildtyp (Reiter 2004). Die Deletion der Nukleoporine Nup120p und Nup170p führte zu einer erhöhten Sensitivität; eine erniedrigte Sensitivität zeigte sich bei den Nukleoporinen Nup60p, Nup84p und dem zytoplasmatischen Protein Gfd1p, das möglicherweise mit Nukleoporinen interagiert (Hodge *et al.* 1999). Reiter postulierte demnach, dass Mutanten mit erhöhter K28-Sensitivität eine vergrößerte Kernpore und solche mit erniedrigter Sensitivität eine verkleinerte Kernpore besitzen, womit ebenfalls der Kernimport von K28 α indirekt verifiziert wurde (Reiter 2004).

Sowohl die erhöhte Toxizität der NLS-K28 α -Varianten, als auch die veränderte Sensitivität der beschriebenen Kernporenmutanten legen einen Kernimport von K28 α nahe, welcher in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden sollte. Durch die ebenfalls von Reiter durchgeführten Untersuchungen an Importin-Deletionsmutanten kann ein aktiver Transport von K28 α durch einzelne Kernimportproteine weitestgehend ausgeschlossen werden (Reiter 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass K28 α entweder durch Bindung an ein noch unbekanntes nukleäres Protein „huckepack“ in den Zellkern gelangt oder passiv in den Nukleus diffundiert, was aufgrund des geringen Molekulargewichts von K28 α (10,5 kDa) prinzipiell vorstellbar ist.

In der vorliegenden Arbeit sollten zur Bestimmung der Lokalisation von K28 α ebenfalls indirekte als auch direkte Nachweismethoden angewendet werden. Zum indirekten Nachweis wurden weitere, intrazellulär exprimierbare K28 α -Varianten mit Kernlokalisations- oder Kernexportsignalen hergestellt und deren Toxizität in Wachstumsanalysen überprüft. Der direkte Nachweis von K28 α umfasste die fluoreszenzmikroskopische Detektion von mRFP-„getaggt“en K28 α -Varianten sowie die Untersuchung von K28-behandelten bzw. K28 α -exprimierenden Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie und Immunogold-Elektronenmikroskopie.

3.1.1 Gerichteter Kernimport bzw. -export von K28 α mittels Kernlokalisations- bzw. Kernexportsequenzen

Analog zu den Untersuchungen von Reiter (2004) sollte in diesem Versuch durch Anfügen einer Kernimport- bzw. Kernexportsequenz versucht werden, die Toxizität intrazellulär exprimierter K28 α -Varianten zu erhöhen bzw. zu erniedrigen. Findet die terminale Wirkung von K28 α tatsächlich im Hefezellkern statt, so sollte ein forcierter Kernimport zu einer

deutlich gesteigerten Toxizität führen; ein gerichteter Kernexport hingegen hätte eine verminderte toxische Wirkung zur Folge.

Die von Reiter 2004 durchgeführten Wachstumsanalysen erfolgten durch Kultivierung der Konstrukt-tragenden Hefestämme unter induzierenden und nicht-induzierenden Bedingungen in Flüssigmedien mit anschließender Bestimmung der Lebendzellzahl. Da mittlerweile mit dem seriellen Verdünnungstest eine besser reproduzierbare und einfacher handhabbare Wachstumsanalyse etabliert ist, wurden die von Reiter erstellten Konstrukte (Abbildung 7) mit dieser Methode erneut auf ihre Toxizität überprüft. Alle Konstrukte bestanden aus der Kernlokalisationssequenz des SV40 T-Antigens, die N-terminal an den ORF von K28 α fusioniert war. Zum fakultativen Abspalten der NLS-Sequenz von K28 α wurde zwischen die NLS- und K28 α -Sequenz zusätzlich eine TEV-Proteaseschnittstelle kloniert (Köhler 2003, Reiter 2004). Einem der Konstrukte war zusätzlich die K28-eigene ER-Signalsequenz prä N-terminal angefügt, da die Toxizität von intrazellulär exprimierten K28 α -Varianten am höchsten ist, wenn K28 α in das ER eingeschleust wird. Ebenso haben K28 α -Varianten einen größeren toxischen Effekt, wenn der K28 α -eigene, C-terminale Argininrest vorhanden ist (Reiter 2004, Kelkel 2009).

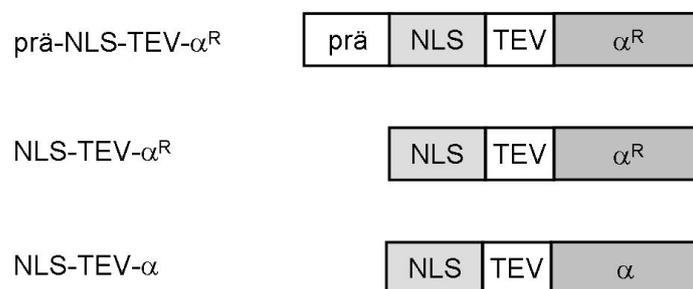


Abbildung 7: Schematische Darstellung der von Reiter 2004 erstellten K28 α -Varianten zum forcierten Import in den Hefenuklear. Alle K28 α -Varianten besitzen am N-Terminus die NLS des großen SV40 T-Antigens sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle zur potentiellen Abspaltung der NLS von K28 α (Reiter 2004).

Alle Konstrukte lagen unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors im Hefeexpressionsvektor pESC^{Trp} vor; die Konstrukte NLS-TEV- α^R und NLS-TEV- α standen unter Kontrolle des stärkeren *GAL1*-Promotors (Expressionsvektor pYES2.1). Die pESC^{Trp}-Vektoren wurden in den *S. cerevisiae* Stamm SEY6210, die pYES2.1-Vektoren in den Stamm BY4742 transformiert. Es zeigte sich, dass auch nach mehreren Versuchen keine Hefeklone nach Transformation mit dem Vektor pESC^{Trp}-prä-NLS-TEV- α^R gewachsen waren. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Reiter 2004 beschrieben. Um die Richtigkeit des Konstrukts prä-NLS-TEV- α^R zu überprüfen, wurde dieses sequenziert. Es stellte sich heraus,

dass die Sequenz nicht mit der von K28 α übereinstimmte, sodass das Konstrukt nicht weiter verwendet und neu hergestellt wurden.

Zur Bestimmung der Toxizität der weiteren K28 α -Varianten wurden die Hefestämme BY4742 bzw. SEY6210, die mit den Vektoren pYES2.1-NLS-TEV- α^R , pYES2.1-NLS-TEV- α bzw. pESC^{Trp}-NLS-TEV- α^R und pESC^{Trp}-NLS-TEV- α transformiert wurden, im seriellen Verdünnungstest überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 gezeigt.

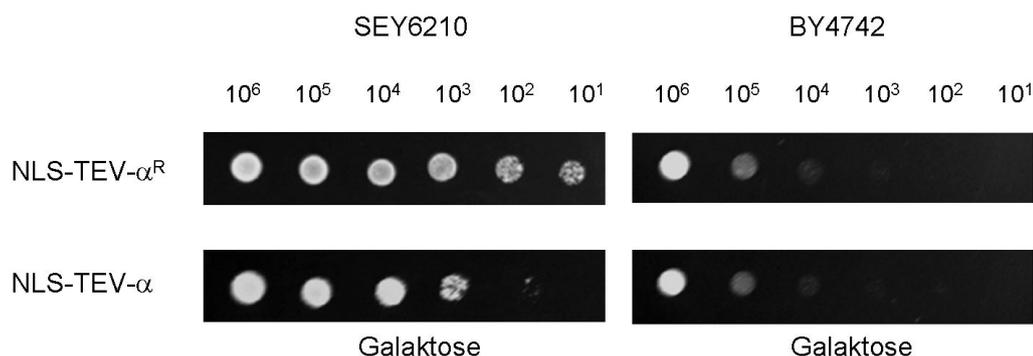


Abbildung 8: Überprüfung der Toxizität der von Reiter 2004 erstellten NLS-K28 α -Konstrukte im seriellen Verdünnungstest. Die Konstrukte lagen bei dem *S. cerevisiae* Stamm SEY6210 im Vektor pESC^{Trp} unter Kontrolle des *GAL10*-Promotors und bei dem Stamm BY4742 im Vektor pYES2.1 unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors vor. Gezeigt sind die Verdünnungsreihen, die unter induzierenden Bedingungen auf Galaktose-haltigen Agarplatten aufgetropft wurden. Unter nicht-induzierenden Bedingungen war in allen Fällen eine Koloniebildung bis zur einschließlich letzten Verdünnungsstufe feststellbar (nicht gezeigt).

Die seriellen Verdünnungstests zeigten bei dem Stamm SEY6210 im Falle des Konstrukts NLS-TEV- α^R ein Wachstum bis einschließlich zur letzten Verdünnungsstufe; die Expression des Konstrukts NLS-TEV- α führte zu einem Wachstum der Zellen bis zur Verdünnungsstufe 10³ und zeigt somit eine schwache Toxizität an. Beide NLS- α -Varianten zeigten hingegen im Stamm BY4742 die gleiche, deutliche Toxizität mit einer Koloniebildung bis zur Verdünnungsstufe 10⁴. Die erhöhte toxische Wirkung im Stamm BY4742 ist darauf zurückzuführen, dass die Konstrukte im Vektor pYES2.1 unter Kontrolle des starken *GAL1*-Promotors exprimiert wurden. Die Ergebnisse stimmen für den Stamm BY4742 mit den Daten von Reiter (2004) überein, wonach die Expression von K28 α mit vorgeschalteter Kernlokalisationssequenz eine toxische Wirkung auf die Zellen hat.

Da das Konstrukt prä-NLS-TEV- α^R nicht in korrekter Form zur Verfügung stand, wurde eine neue NLS-K28 α -Variante mit N-terminaler K28-Signalsequenz hergestellt. Auf eine Proteaseschnittstelle zwischen NLS- und K28 α -Sequenz wurde verzichtet. Des Weiteren wurde ein Konstrukt erstellt, das statt der Kernlokalisationssequenz eine Kernexportsequenz enthielt. Ein gerichteter Kernexport sollte eine verminderte Toxizität zur Folge haben, wenn

der Nukleus den terminalen Wirkungsort von K28 α darstellt. Zum forcierten Kernimport bzw. -export fanden die Kernlokalisationssequenz PKKKRKV des großen T-Antigens des Affen-Virus 40 (SV40) und die Kernexportsequenz LEGRILAAALTL von Importin β (Kap95p) aus *S. cerevisiae* Anwendung.

Beide Konstrukte wurden mittels SOE-PCR aus dem Vektor pPGK-M28I als Template amplifiziert (Abbildung 9). Das Konstrukt prä-NLS- α^R wurde mit den Primern 1, 2, 3 und 4, das Konstrukt prä-NES- α^R mit den Primern 1, 4, 5 und 6 amplifiziert und beide anschließend in den Vektor pYES2.1 einkloniert.

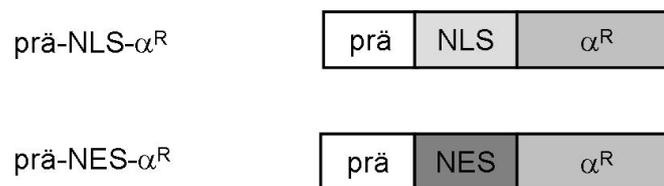


Abbildung 9: Schematische Darstellung der K28 α -Konstrukte zum gerichteten Kernimport und -export. Als Kernlokalisationssequenz fand die NLS des großen SV40 T-Antigens PKKKRKV Verwendung. Bei der Kernexportsequenz NES handelte es sich um die AS-Sequenz LEGRILAAALTL von Kap95p aus *S. cerevisiae*.

Die Bestimmung der Toxizität der Konstrukte erfolgte nach Transformation der Vektoren pYES2.1-prä-NLS- α^R und pYES2.1-prä-NES- α^R in den *S. cerevisiae* Stamm BY4742 mittels seriellem Verdünnungstest (Abbildung 10).

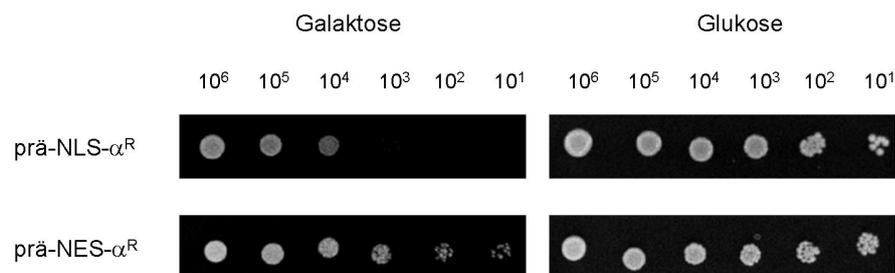


Abbildung 10: Überprüfung der Toxizität von prä-K28 α -Varianten mit zusätzlicher NLS- bzw. NES-Sequenz zum forcierten Kernimport bzw. -export. Die Vektoren pYES2.1-prä-NLS- α^R bzw. pYES2.1-prä-NES- α^R wurden in *S. cerevisiae* BY4742 transformiert und dessen Sensitivität im seriellen Verdünnungstest überprüft.

Die Toxizität des Konstrukts prä-NLS- α^R entsprach dabei in etwa den von Reiter hergestellten NLS-K28 α -Varianten und führte zu einem Wachstum der Zellen bis zur Verdünnungsstufe 10^4 . Das Vorhandensein der ER-Signalsequenz prä scheint somit keinen Einfluss auf die Toxizität von K28 α zu haben, wenn dieses durch eine NLS-Sequenz

gerichtet in den Kern transportiert wird. Beim Vergleich des Konstrukts prä-NLS- α^R mit einer K28 α -Variante, die lediglich aus der ER-Signalsequenz (prä) und dem K28 α -ORF besteht (Kelkel 2009), zeigte sich, dass die zusätzliche NLS-Sequenz die Toxizität von K28 α minimal vermindert. Im seriellen Verdünnungstest führte das Konstrukt prä- α^R zu einem Wachstum bis zur Verdünnungstufe 10^5 .

BY4742-Zellen, die das Konstrukt prä-NES- α^R exprimierten, zeigten hingegen ein Wachstum bis zur letzten Verdünnungsstufe 10^1 und somit eine vollständige Resistenz gegenüber dieser K28 α -Variante. Der Umstand, dass ein forcierter Kernexport die Toxizität von K28 α vollständig aufhebt, legt nahe, dass eine nukleäre Lokalisation von K28 α obligatorisch für dessen toxische Wirkung ist. Diese Beobachtung stellt einen weiteren indirekten Hinweis für den Kernimport von K28 α dar. Ein Nachweis von prä-NLS- α^R und prä-NES- α^R im Western-Blot blieb auch nach mehreren Versuchen erfolglos (Daten nicht gezeigt).

Um die Wirkung der Kernimport- und -exportvarianten von K28 α näher zu untersuchen, wurde zusätzlich die Sensitivität von Kernporenmutanten getestet. Es handelte sich dabei um jene Mutanten, die bei Reiter 2004 im MBA-Test eine signifikant verminderte bzw. erhöhte Sensitivität gegenüber K28 zeigten. Es wurde postuliert, dass die Kernporen dieser Mutanten einen veränderten Durchmesser besitzen, womit die Diffusion von K28 α in den Kern erschwert bzw. erleichtert ist (Reiter 2004). Zur Überprüfung der Mutanten $\Delta nup60$, $\Delta nup84$, $\Delta nup120$, $\Delta nup170$ und $\Delta gfd1$ wurden diese mit den Plasmiden pYES2.1-prä-NLS- α^R und pYES2.1-prä-NES- α^R transformiert und deren Sensitivität im seriellen Verdünnungstest überprüft (Abbildung 11).

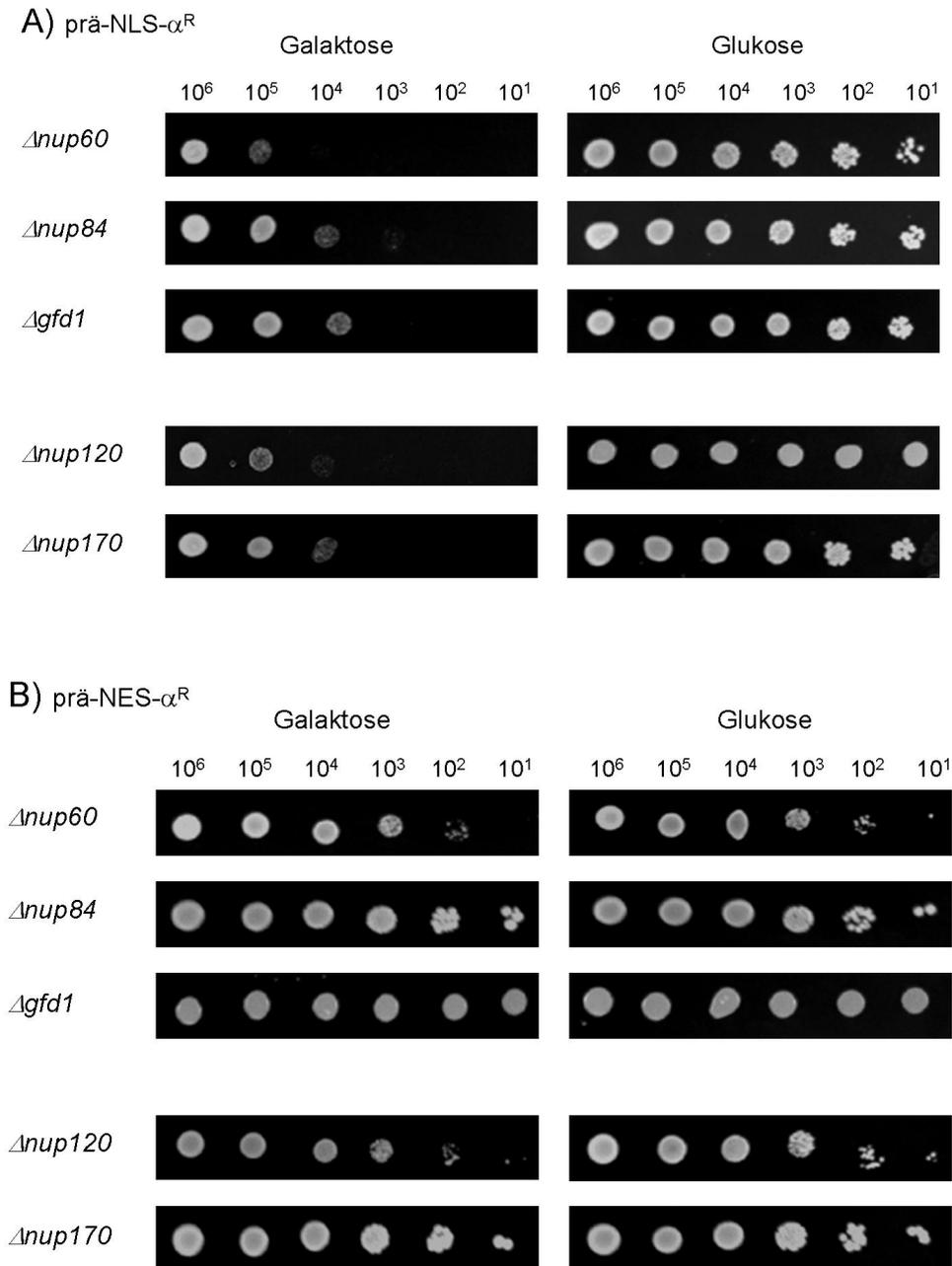


Abbildung 11: Überprüfung der Toxizität von prä-K28 α -Varianten mit zusätzlicher NLS- bzw. NES-Sequenz zum forcierten Kernimport bzw. -export in Kernporenmutanten mit veränderter K28-Sensitivität. Die Mutanten *$\Delta nup60$* , *$\Delta nup84$* , und *$\Delta gfd1$* zeigten im MBA gegen von außen appliziertem K28-Toxin eine verminderte, *$\Delta nup120$* , *$\Delta nup170$* eine erhöhte Sensitivität (Reiter 2004). Die Kernporenmutanten wurden **A)** zum gerichteten Kernimport von K28 α mit dem Plasmid pYES2.1-prä-NLS- α^R und **B)** zum gerichteten Kernexport von K28 α mit dem Plasmid pYES2.1-prä-NES- α^R transformiert und deren Sensitivität jeweils im seriellen Verdünnungstest überprüft.

Das Konstrukt prä-NLS- α^R führte in allen Deletionsmutanten noch zu einem Wachstum in den Verdünnungsstufen 10^3 bis 10^5 und zeigte damit nahezu die gleiche Toxizität wie im Wildtypstamm BY4742 (Wachstum bis 10^3 , vgl. Abbildung 10). Eine deutlich verminderte Sensitivität der Mutanten *$\Delta nup60$* , *$\Delta nup84$* und *$\Delta gfd1$* bzw. erhöhte Sensitivität der Mutanten

Δnup120, *Δnup170*, wie sie im MBA mit von außen appliziertem Toxin beschrieben wurde (Reiter 2004), konnte hier nicht beobachtet werden.

Bei Expression des Konstrukts prä-NES- α^R zeigten alle Kernporenmutanten noch eine Koloniebildung bis zur Verdünnungsstufe 10^1 und waren somit vollständig resistent gegenüber dieser K28 α -Variante. Wie im Falle des Wildtypstammes BY4742 führte der gerichtete Kernexport somit auch bei Deletion bestimmter Nukleoporene zu einem Verlust der Toxizität von K28 α .

Die Mehrzahl an Proteinen, die in den Nukleus importiert werden, trägt ihre Kernimportsequenz am N-Terminus, jedoch sind auch wenige Proteine mit C-terminaler NLS-Sequenz bekannt (Kenna *et al.* 1997, Bordonné 2000). Aus diesem Grund wurde eine weitere K28 α -Variante hergestellt, bei der die Kernimportsequenz an das C-terminale Ende fusioniert wurde. Um auch hier einen direkten Vergleich zwischen gerichtetem Kernimport und -export zu ermöglichen, wurde zusätzlich eine K28 α -Variante mit C-terminaler NES-Sequenz hergestellt. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, welchen Weg innerhalb der Zelle prä-K28 α -Varianten durchlaufen (Sendzik 2006, Kelkel 2009). Dabei konnte gezeigt werden, dass K28 α nach ER-Import bis in den späten Golgi-Apparat transportiert und auf noch unbekanntem Weg zurück in das Zytosol retrotransloziert wird (Kelkel 2009). Im späten Golgi-Apparat befindet sich die Kex2p-Protease, die C-terminal der Erkennungssequenz IQSR schneidet, welche sich am C-terminalen Ende von K28 α befindet (Riffer *et al.* 2002). Um ein Abspalten der an das C-terminale Ende von K28 α angefügten NLS bzw. NES zu verhindern, war es nötig, die Kex2p-Erkennungssequenz IQSR zur Sequenz IQSA zu mutieren.

Zur Herstellung der K28 α -Varianten prä α^{R149A} NLS und prä α^{R149A} NES (Abbildung 12) wurde als Template der Vektor pYES2.1-K28SS α^R verwendet, der einen ORF bestehend aus K28-eigener Signalsequenz prä und der K28 α -Sequenz enthält (Kelkel 2009). Als 5'-Primer fand stets Primer 1 Anwendung. Mit Hilfe der 3'-Primer 7 und 8 wurden NLS- und NES-Sequenzen C-terminal an K28 α angefügt sowie zusätzlich die Kex2p-Erkennungssequenz IQSR zu IQSA mutiert. Bei dem Kernimportsignal handelte es sich auch in diesem Fall um die NLS-Sequenz PKKKRKV des großen SV40 T-Antigens; bei dem Kernexportsignal um die NES-Sequenz LEGRILAAALTL von Kap95p.

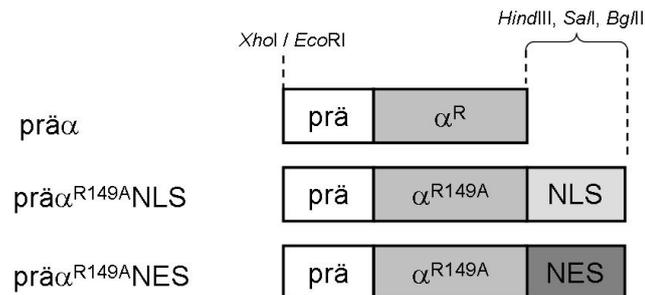


Abbildung 12: Schematische Darstellung der K28α-Varianten mit C-terminaler NLS bzw. NES zum gerichteten Kernimport bzw. -export von K28α. Alle Konstrukte enthalten im 5'-Bereich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XhoI und EcoRI sowie im 3'-Bereich Schnittstellen für BglII, Sall und HindIII.

Alle Konstrukte wurden nach Amplifikation durch TOPO-Klonierung in den Vektor pSTBlue-1 (NOVAGEN) eingebracht und sequenziert, mit Ausnahme des Konstrukts präα, das bereits sequenziert im Vektor pYES2.1-K28SSα^R (Kelkel 2009) vorlag. Zur Expression der verschiedenen K28α-Varianten in *S. cerevisiae* wurden diese nach Restriktionsverdau (*EcoRI/BglII*) in den in Abbildung 5 dargestellten Hefeexpressionsvektor pRS316-Erd2.6 (*EcoRI/BamHI*) ligiert. Der Vektor basiert auf dem Hefe-Zentromervektor pRS316 (Sikorski & Hieter 1989) und enthält zusätzlich die zur Galaktose-induzierbaren Expression erforderliche Promotorsequenz P_{GAL1} und eine *CYC1*-Terminatorsequenz (Gießelmann 2007). Die so klonierten Plasmide pRS316-präα, pRS316-präα^{R149A}NLS und pRS316-präα^{R149A}NES wurden in *S. cerevisiae* BY4742 transformiert und die Toxizität der K28α-Varianten im seriellen Verdünnungstest untersucht (Abbildung 13).

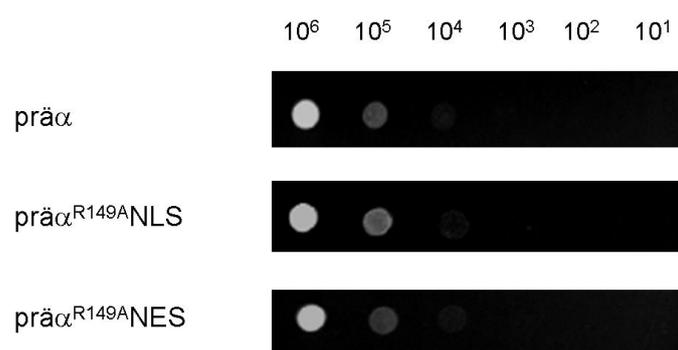


Abbildung 13: Serieller Verdünnungstest zur Überprüfung der Toxizität von K28α-Varianten mit C-terminaler NLS bzw. NES. Die Konstrukte lagen unter Kontrolle des induzierbaren Promotors P_{GAL1} im Hefezentromervektor pRS316 vor. Um eine Abspaltung der Zielsteuerungs-Sequenzen durch Kex2p zu verhindern, wurde die Kex2p-Erkennungssequenz IQSR zu IQSA mutiert.

Die Wachstumsanalyse aus Abbildung 13 lässt ein Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10^4 erkennen, unabhängig davon, ob eine NLS bzw. NES C-terminal an prä-K28 α fusioniert wurde. Kernimport- und -exportsequenz scheinen somit am C-Terminus von K28 α nicht mehr funktionell zu sein, da keine erhöhte bzw. verminderte Toxizität festzustellen war. Um auch in diesem Fall einen möglichen Einfluss des Kernporendurchmessers auf die Toxizität der K28 α -Varianten zu überprüfen, wurden die Vektoren pRS316-prä α , pRS316-prä α^{R149A} NLS und pRS316-prä α^{R149A} NES in die Deletionsmutanten $\Delta nup60$, $\Delta nup84$, $\Delta nup120$, $\Delta nup170$ und $\Delta gfd1$ transformiert und auf *in vivo* Toxizität überprüft. Abbildung 14 zeigt stellvertretend die Ergebnisse der Wachstumstests mit der Kernporenmutante $\Delta nup120$. Diese Mutante zeigte bei Reiter 2004, neben der $\Delta nup170$ -Mutante, die deutlichste K28-Sensitivität im MBA-Test.

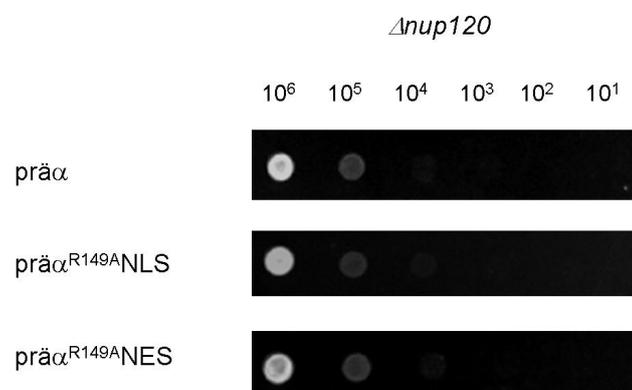


Abbildung 14: Serieller Verdünnungstest zur Überprüfung der Toxizität von K28 α -Varianten mit C-terminaler NLS bzw. NES in der Kernporen-Deletionsmutante $\Delta nup120$. Die Konstrukte lagen im Hefezytomervektor pRS316 mit zusätzlicher Promotorsequenz P_{GAL1} und CYC1-Terminator vor. Getestet wurde die Kernporendeletionsmutante $\Delta nup120$.

Der Wachstumstest in Abbildung 14 lässt erkennen, dass auch in der Deletionsmutante $\Delta nup120$ alle Konstrukte noch ein schwaches Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10^4 zulassen. Alle weiteren getesteten Kernporenmutanten ($\Delta nup60$, $\Delta nup84$, $\Delta nup170$ und $\Delta gfd1$) zeigten ebenfalls bei allen drei Konstrukten eine Koloniebildung bis zur Verdünnungsstufe 10^4 (nicht gezeigt). In Anbetracht der Tatsache, dass alle K28 α -Varianten mit C-terminaler Kernimport- bzw. -exportsequenz sowohl im Wildtypstamm BY4742 als auch in den Kernporenmutanten die gleiche toxische Wirkung wie das Konstrukt prä α aufwiesen, muss davon ausgegangen werden, dass die NLS- und NES-Sequenzen am C-Terminus von K28 α nicht mehr funktionell waren. Ein gerichteter Kernimport bzw. -export fand daher nicht mehr statt, sodass ein indirekter Nachweis der terminalen Kernlokalisierung von K28 α mit diesen Konstrukten nicht möglich war.

Insgesamt konnten die Versuche zum gerichteten Kernimport und -export von K28 α die Hypothese untermauern, dass der Zellkern den terminalen Wirkungsort der toxischen α -Untereinheit darstellt. Die seriellen Verdünnungstests mit den von Reiter 2004 erstellten Konstrukten bestätigten die Beobachtung, wonach K28 α -Varianten mit N-terminaler NLS-Sequenz ohne prä-Domäne eine toxische Wirkung auf Hefezellen besitzen. Zytosolisch exprimiertes K28 α zeigt keinen toxischen Effekt (Sendzik 2006, Kelkel 2009), sodass davon auszugehen ist, dass nur bei forciertem Kernimport genügend K28 α -Moleküle in den Kern gelangen, um eine Abtötung der Zellen hervorzurufen. Ein weiteres Indiz für die zur Toxizität obligatorische nukleäre Lokalisation von K28 α stellen die Ergebnisse des Wachstumstests mit dem Konstrukt prä-NES- α^R dar. Sowohl Zellen des Wildtypstammes BY4742 als auch Mutanten, bei denen einzelne Nukleoporine deletiert wurden, zeigten eine vollständige Resistenz gegenüber dieser K28 α -Variante. Durch die vorhandene NES-Sequenz wird die ansonsten letal wirkende K28 α -Untereinheit nach passiver Diffusion in den Hefenuklear wieder gerichtet exportiert, sodass eine konstante nukleäre Lokalisation von K28 α nicht möglich ist. Somit deuten auch diese Ergebnisse indirekt an, dass der Nuklear den terminalen Wirkungsort von K28 α darstellt.

3.1.2 Untersuchungen zur nukleären Lokalisation von K28 α durch mRFP-Fusionen

Neben den in Punkt 3.1.1 beschriebenen indirekten Nachweismethoden zur Bestimmung der Lokalisation von K28 α sollten in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Methoden angewendet werden, die eine direkte Detektion der toxischen Untereinheit erlauben. Eine elegante Methode zur Bestimmung der Lokalisation eines Proteins in lebenden Zellen stellt die Fusion des zu untersuchenden Proteins mit einem Fluoreszenzprotein und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Detektion dar (Huh *et al.* 2003). Bei einem Import von K28 α in den Zellkern sollte auch ein Fusionsprotein, bestehend aus K28 α und einem Fluoreszenzprotein, in den Kern importiert werden und die Fluoreszenz detektierbar sein. Als Fluoreszenzprotein fand das rot fluoreszierende mRFP („monomeric red fluorescent protein“) Anwendung. Es handelt sich dabei um eine gentechnisch veränderte Form des aus *Discosoma spec.* stammenden, tetrameren DsRed, welche schon in monomerer Form fluoresziert und somit zur Bestimmung von Proteinlokalisationen geeignet ist (Campbell *et al.* 2002). Zusätzlich stand eine GFP-„getaggte“ Variante des kernständigen Proteins Prp20p zur Verfügung (Hahn *et al.* 2008), die für Ko-Lokalisationsexperimente verwendet werden sollte.

Zur Bestimmung der *in vivo* Lokalisation von K28 α in *S. cerevisiae* sollten verschiedene Fusionsvarianten bestehend aus K28 α und mRFP kloniert, in *S. cerevisiae* exprimiert und

fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden. Signale von mRFP im Nukleus der Hefen würden einen Kernimport von K28 α bestätigen. Abbildung 15 gibt einen Überblick über die in der vorliegenden Arbeit erstellten K28 α -mRFP-Chimären. Es wurden insgesamt vier Konstrukte hergestellt, bei denen mRFP C-terminal an K28 α fusioniert wurde. K28 α sollte trotz Fusion an mRFP seine Funktionalität behalten, da die Detektion von toxisch inaktiven K28 α -Varianten letztendlich keinen Rückschluss auf die korrekte Lokalisation der aktiven, toxischen Untereinheit erlaubt. Um daher die toxische Wirkung von K28 α zu gewährleisten, enthielten die Varianten prä α mRFP und prä α^{R149A} mRFP die K28-eigene ER-Importsequenz prä und die Variante NLS α mRFP das N-terminale Kernlokalisierungssignal PKKKRKV des SV40 T-Antigens. Wie bereits unter Punkt 3.1.1 beschrieben, induzieren nur K28 α -Varianten mit N-terminaler prä-Domäne oder NLS-Sequenz einen Selbstkillerphänotyp. Als Kontrolle wurde zusätzlich die zytosolische Variante α mRFP hergestellt. Bei dem Konstrukt prä α^{R149A} mRFP war die Erkennungssequenz IQSR der im Golgi-Apparat lokalisierten Protease Kex2p zu IQSA mutiert, um zu gewährleisten, dass beim Durchtritt durch den Sekretionsweg das Fluoreszenzprotein nicht von K28 α getrennt wird (vgl. Punkt 3.1.1). Als Kontrolle wurde die nicht mutierte Variante prä α mRFP konstruiert.

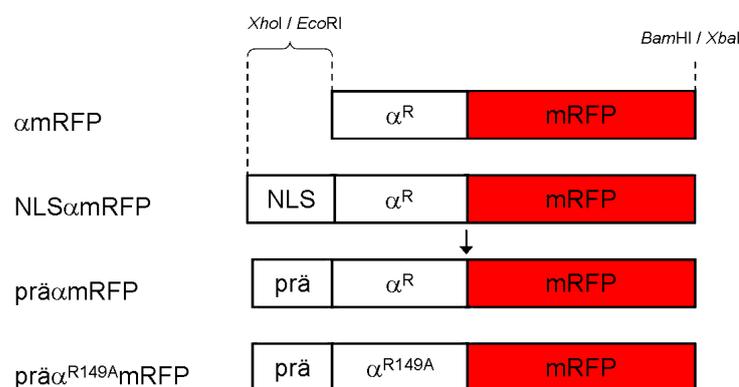


Abbildung 15: Schematische Darstellung der zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion hergestellten Toxinchimären, bestehend aus K28 α -Varianten mit C-terminaler mRFP-Fusion. Bei der Kernimportsequenz handelte es sich um die NLS-Sequenz PKKKRKV des großen SV40 T-Antigens. Die K28 α -Varianten wurden mittels SOE-PCR mit mRFP fusioniert.
 ↓: Kex2p-Proteaseschnittstelle

Die Herstellung der Toxin-mRFP-Chimären erfolgte auf DNA-Ebene mittels SOE-PCR. Als Templates dienten in allen Fällen die Plasmide pYES2.1-K28SS α^R und pFB2-mRFP. Das Konstrukt α mRFP wurde mit den Primern 9, 10, 11 und 12, das Konstrukt NLS α mRFP mit den Primern 10, 11, 12 und 13, das Konstrukt prä α mRFP mit den Primern 1, 10, 11 und 12, sowie das Konstrukt prä α^{R149A} mRFP mit den Primern 1, 12, 14 und 15 hergestellt. Alle Amplifikate wurden mittels TA-Klonierung in den Vektor pSTBlue-1 ligiert und sequenziert.

Zur induzierbaren Expression in *S. cerevisiae* wurden alle Konstrukte in den Hefezentromervektor pRS316 mit zusätzlichem *GAL1*-Promotor und *CYC1*-Terminator kloniert. Dazu wurden die zur Sequenzierung verwendeten Plasmide pSTBlue-1- α mRFP, pSTBlue-1-NLS α mRFP, pSTBlue-1-prä α mRFP und pSTBlue-1-prä α^{R149A} mRFP jeweils mit *EcoRI* und *BglII* verdaut und in den *EcoRI/BamHI*-geschnittenen Vektor pRS316-Erd2.6 einkloniert. Die so hergestellten Plasmide pRS316- α mRFP, pRS316-NLS α mRFP, pRS316-prä α mRFP und pRS316-prä α^{R149A} mRFP wurden in *S. cerevisiae* BY4742 transformiert und zunächst die Toxizität der K28 α -mRFP-Chimären mittels seriellem Verdünnungstest überprüft (Abbildung 16).

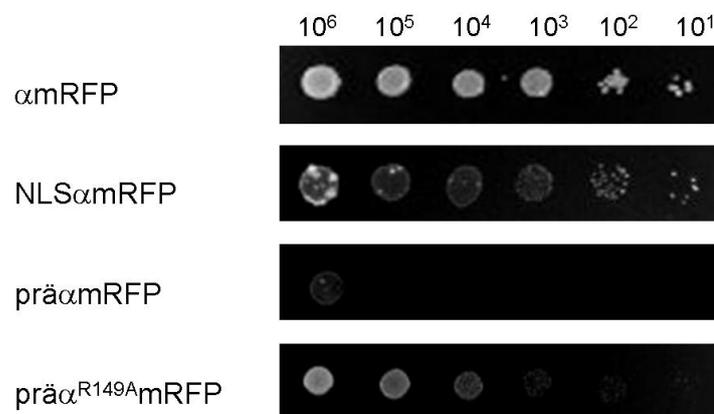


Abbildung 16: Serieller Verdünnungstest zur Überprüfung der Toxizität der K28 α -mRFP-Toxinchimären. Die Konstrukte lagen im Hefezentromervektor pRS316 unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors vor.

Der serielle Verdünnungstest zeigte, dass mit Ausnahme des Konstrukts prä α mRFP alle Fusionsvarianten keine toxische Wirkung auf die Hefezellen hatten. Somit muss davon ausgegangen werden, dass entweder K28 α durch die Fusion mit mRFP nicht mehr funktionell war, oder dass das Fusionsprotein aufgrund der Größe nicht mehr frei in den Hefenuklear diffundieren konnte. Das noch toxische Chimär prä α mRFP besitzt am C-terminalen Ende der α -Domäne die Kex2p-Erkennungssequenz IQSR, sodass es zu einer Spaltung zwischen K28 α und mRFP im Golgi-Apparat kommen kann, worauf die α -Untereinheit nach Rücktransport und Retrotranslokation ins Zytosol in den Kern gelangen und dort seine toxische Wirkung entfalten kann. Die Variante mit mutierter Kex2p-Erkennungssequenz hingegen wird nicht gespalten. Die ausgebliebene Toxizität kann darauf zurückgeführt werden, dass die K28 α -mRFP-Fusion nicht mehr korrekt in das Zytosol und somit auch nicht mehr in den Kern gelangen konnte. Trotz der ausgebliebenen Toxizität bei drei der vier Toxin-mRFP-Chimären wurde die Lokalisation von allen Varianten fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Dazu wurden die Hefen zunächst ü. N. in Ura d/o

Raffinose-Medium kultiviert, bis eine ausreichende Zellzahl vorhanden war. Die Expression der K28 α -mRFP-Fusionen wurde durch Überführen der Zellen in Ura d/o Galaktose-Medium induziert. Um eine bessere Faltung von mRFP zu ermöglichen, wurde die Expression bei 20 °C durchgeführt (Tsien 1998). Nach einer Expressionszeit von 2 h waren bereits Fluoreszenzsignale zu erkennen. Da diese jedoch sehr schwach waren, wurden für die in Abbildung 17 gezeigten Aufnahmen Zellen mikroskopiert, die 16 h induziert wurden. Die Verteilung der Signale änderte sich im Laufe der Expression nicht. Parallel dazu wurde versucht, die K28 α -mRFP-Fusionen mittels Western-Analyse zu detektieren. Ein Nachweis der Fusionen war weder mit primärem K28 α - noch mit DsRed-Antikörper möglich.

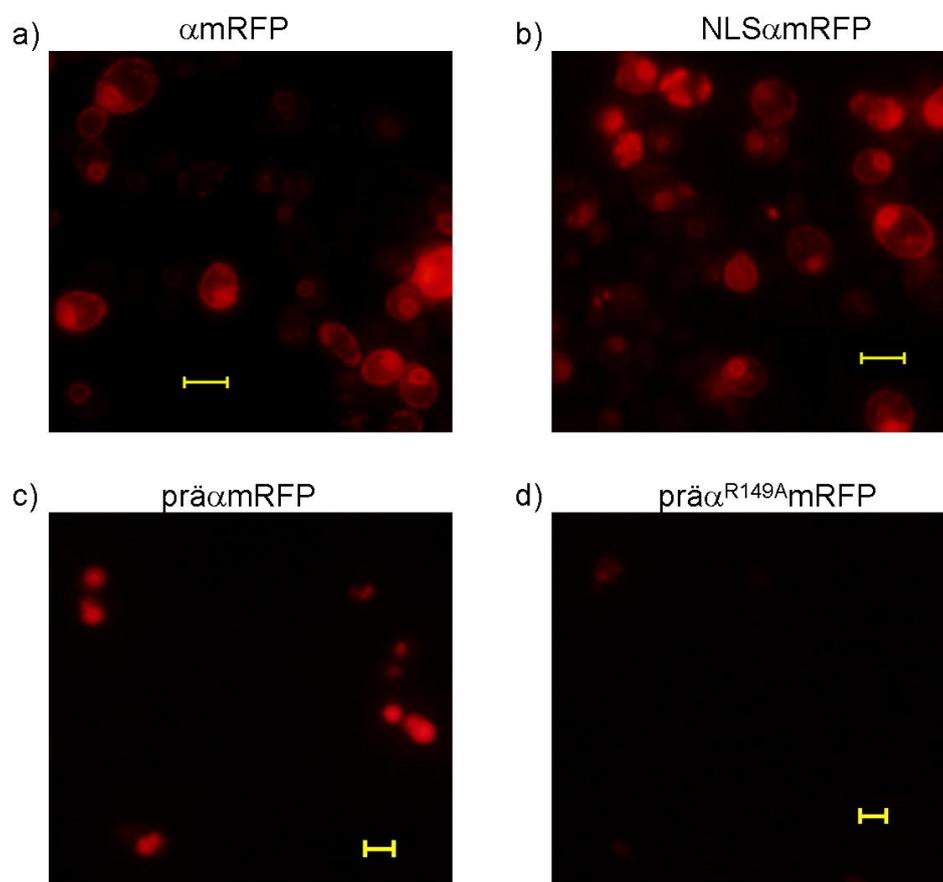


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie von *S. cerevisiae* BY4742 nach Expression verschiedener K28 α -mRFP-Varianten zur Bestimmung des Kernimports von K28 α . Transformierte Zellen des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 wurden ü.N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert und zur Expression in Ura d/o Galaktose-Medium überführt. Die Anfertigung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte nach 16stündiger Expressionszeit. Messbalken: 5 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtungszeit: 2s

Zellen, die die zytosolische α mRFP-Variante bzw. die nukleäre Variante NLS α mRFP exprimierten, wiesen überraschenderweise eine Verteilung der Fluoreszenzsignale in der Kernmembran und im peripheren ER auf. Dies ist insofern ungewöhnlich, da eine für den

ER-Import obligatorische ER-Signalsequenz in diesen Konstrukten fehlt. Das Kontrollkonstrukt prä α mRFP, bei dem durch Kex2p K28 α und mRFP im Golgi-Apparat getrennt werden, führte zu einer diffus über die gesamten Zellen verteilte Fluoreszenz. Fluoreszenzsignale des Konstrukts prä α ^{R149A}mRFP waren, auch nach Überprüfung mehrerer Klone, nicht zu erkennen.

Eine genaue Bestimmung der natürlichen Lokalisation von K28 α konnte somit mittels Fusion an mRFP nicht erbracht werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Fusionsvarianten in den Zellen fehllokalisierten. Die Tatsache, dass keines der Konstrukte (mit Ausnahme von prä α mRFP) toxisch wirkte, unterstützt diese Annahme.

Zur Klärung der Frage, warum zytosolisch und nukleär exprimierte K28 α -mRFP-Varianten eine ER-Lokalisation aufwiesen, wurde die Deletionsmutante Δ doa10 ebenfalls mit den Vektoren pRS316- α mRFP und pRS316-NLS α mRFP transformiert und nach Expression im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei Doa10p handelt es sich um eine Ubiquitin-Ligase, die für den Abbau zytosolischer ERAD-Substrate verantwortlich ist und ebenfalls in der Kernmembran und im peripheren ER lokalisiert ist (Deng & Hochstrasser 2006, Metzger *et al.* 2008). Es ist vorstellbar, dass die K28 α -mRFP-Varianten aufgrund von Fehlfaltungen von Doa10p als zytosolische ERAD-Substrate erkannt und gebunden wurden. Durch Untersuchung der Deletionsmutante sollte überprüft werden, ob die Fluoreszenzsignale von α mRFP und NLS α mRFP möglicherweise auf eine Interaktion mit Doa10p zurückzuführen waren. Die Fluoreszenzaufnahmen der transformierten Δ doa10 Mutante (Abbildung 18) zeigten, dass α mRFP und NLS α mRFP die gleiche Lokalisierung wie im Wildtypstamm BY4742 aufwiesen. Die „ER-Signale“ können somit nicht auf eine Interaktion mit Doa10p zurückgeführt werden.

Der Fokus der Untersuchungen konzentrierte sich auf die Verifizierung der nukleären Lokalisation von K28 α . Da diese mit den verwendeten K28 α -mRFP-Fusionen nicht erbracht werden konnte, wurde an dieser Stelle nicht weiter untersucht, warum die Fusionsvarianten die ungewöhnliche Fehllokalisation am oder im ER aufwiesen.

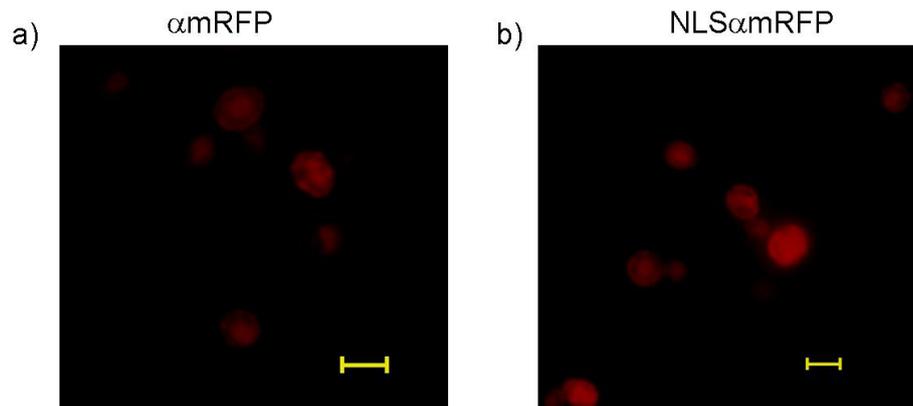


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopie von BY4742 Δ doa10 nach Expression der K28 α -mRFP-Varianten α mRFP und NLS α mRFP. Transformierte Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes BY4742 Δ doa10 wurden \ddot{u} . N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert und zur Induktion der Expression in Ura d/o Galaktose-Medium \ddot{u} berf \ddot{u} hrt. Die Anfertigung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte nach 16st \ddot{u} ndiger Expressionszeit. Messbalken: 5 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtungszeit: 1,8s

3.1.3 Mikroskopischer Nachweis von K28 α im Hefezellkern mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF)

Da die Bestimmung der nukle \ddot{a} ren Lokalisation von K28 α durch dessen Fusion mit dem Fluoreszenzprotein mRFP nicht m \ddot{o} glich war, wurde im n \ddot{a} chsten Schritt versucht, K28 α durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF) in den Hefezellen nachzuweisen. Bei dieser Methode werden fixierte und permeabilisierte Zellen mit einem prim \ddot{a} ren Antik \ddot{o} rper inkubiert, der gegen das Protein gerichtet ist, dessen Lokalisation bestimmt werden soll. Ein sekund \ddot{a} rer, fluoreszenzmarkierter Antik \ddot{o} rper erm \ddot{o} glicht dann die mikroskopische Detektion. Der klare Vorteil dieser Methode im Vergleich zur intrazellul \ddot{a} ren Expression von Fusionen aus K28 α und mRFP lag in diesem Fall darin begr \ddot{u} ndet, dass zur Untersuchung wildtypisches K28-Toxinkonzentrat verwendet werden konnte, bei dem das Toxin auf seinem „nat \ddot{u} rlichen“ Weg von der Zellwand retrograd \ddot{u} ber Golgi-Apparat und ER ins Zytosol transportiert wird. Ein m \ddot{o} gliches „Fehl-Targeting“, wie es bei intrazellul \ddot{a} rer Expression von K28 α -mRFP-Fusionen auftrat, konnte somit vermieden werden. F \ddot{u} r die Versuche standen ein polyklonaler K28 α -Antik \ddot{o} rper sowie ein polyklonaler Antik \ddot{o} rper gegen das K28-Volll \ddot{a} ngentoxin zur Verf \ddot{u} gung.

Im ersten Versuch wurden Hefezellen zur Inkubation mit K28 eingesetzt. Bereits aus fr \ddot{u} heren Arbeiten ist bekannt, dass Hefezellen mit noch vorhandener Zellwand in Fl \ddot{u} ssigmedium K28 nur sehr ineffizient aufnehmen (Reiter 2004). Verbessert werden kann die Toxinaufnahme durch Kultivierung der Zellen in einem Medium, das 50 mM CaCl $_2$ und 0,01 M Citrat enth \ddot{a} lt und dessen pH-Wert auf 4,7 herabgesetzt ist (Schmitt & Radler 1987). Aus diesem Grund wurden Zellen des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 zun \ddot{a} chst in YPCCa-

Medium ü. N. kultiviert. Von dieser Kultur wurden 1×10^7 Zellen/ml in Inkubationspuffer überführt und diesem 20 % 100x K28-Konzentrat zugegeben. Zur Aufnahme des Toxins wurden die Zellen 7 h bei 20 °C und 110 rpm geschüttelt. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass K28-behandelte *S. cerevisiae* Zellen nach etwa 5 h erste Wachstumsdefekte zeigen (Kelkel 2009). Somit ist davon auszugehen, dass K28 α innerhalb dieser Zeit seinen terminalen Wirkungsort erreicht und den Zellzyklusarrest induziert. Im Anschluss an die K28-Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen, um überschüssiges Toxin von den Zellwänden zu entfernen. Die Präparation der Zellen zur IIF wurde nach einem Protokoll von Roberts *et al.* (1991) durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde zunächst der anti-K28 α -Antikörper 1:10-verdünnt eingesetzt. Bei dem sekundären Antikörper (1:100) handelte es sich um einen FITC-markierten anti-rabbit-Antikörper. Zusätzlich wurde analog ein Kontrollansatz angefertigt, bei dem der Inkubationspuffer kein Toxinkonzentrat enthielt. Die präparierten und gefärbten Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abbildung 19).

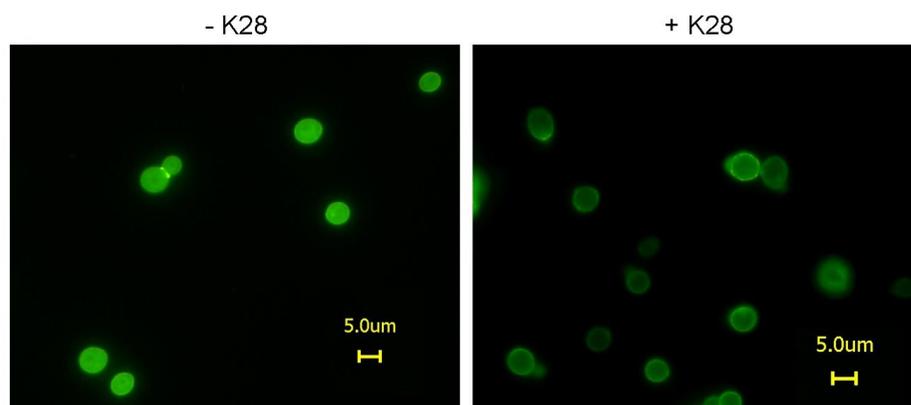


Abbildung 19: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie K28-behandelter BY4742 Zellen zum intrazellulären Nachweis von K28 α . 1×10^7 Zellen des Stammes BY4742 wurden 7 h bei 20 °C und 110 rpm mit 20 % 100x K28-Konzentrat in Inkubationspuffer (+ K28) bzw. nur Inkubationspuffer (- K28) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, sphäroplastiert und nach Permeabilisation mit anti-K28 α -Antikörper (1:10) auf Poly-Lysin-beschichteten Objektträgern inkubiert. Der sekundäre, FITC-gekoppelte anti-rabbit-Antikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Messbalken: 5 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtungszeit: 1/7s

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte, dass sowohl mit K28-Toxin behandelte als auch unbehandelte Zellen deutliche Fluoreszenzsignale aufwiesen. K28-behandelte Zellen zeigten die deutlichste Fluoreszenz im Bereich der Zellperipherie, unbehandelte Zellen fluoreszierten gleichmäßig über das gesamte Zellvolumen verteilt. Die Signale der unbehandelten Zellen können u.a. auf eine Kreuzreaktion des anti-K28 α -Antikörpers zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurden die bereits präparierten Zellen mit dem primären, polyklonalen anti-K28-Antikörper (1:10) inkubiert und fluoreszenz-mikroskopisch untersucht (Abbildung 20).

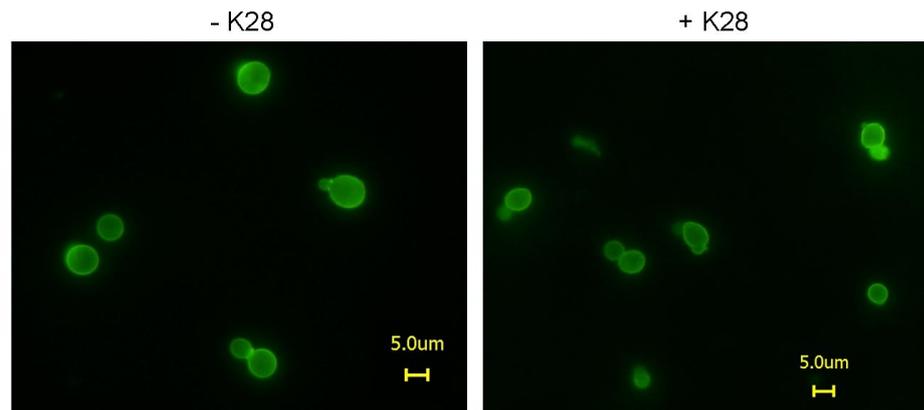


Abbildung 20: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie K28-behandelter BY4742 Zellen zum intrazellulären Nachweis von K28. 1×10^7 Zellen des Stammes BY4742 wurden 7 h bei 20 °C und 110 rpm mit 20 % 100x K28-Konzentrat in Inkubationspuffer (+ K28) bzw. nur Inkubationspuffer (- K28) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, sphäroplastiert und nach Permeabilisation mit anti-K28-Antikörper (1:10) auf Poly-Lysin-beschichteten Objektträgern inkubiert. Der sekundäre, FITC-gekoppelte anti-rabbit-Antikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Messbalken: 5 µm. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtungszeit: 1/15s

Auch mit dem anti-K28-Antikörper, der gegen das Vollängentoxin gerichtet ist, ließen sich die gleichen Fluoreszenzsignale bei unbehandelten und behandelten Zellen erkennen. Es zeigte sich in beiden Proben eine Fluoreszenz, die über die gesamte Zelle verteilt war. Die Peripherie der Zellen wies dabei in beiden Proben die stärkste Fluoreszenz auf.

Sowohl mit dem anti-K28 α - als auch mit dem anti-K28-Antikörper waren keine definierten Fluoreszenzsignale in den Zellen zu erkennen. Die Tatsache, dass in beiden Fällen auch unbehandelte Zellen ähnliche Signale zeigten wie behandelte Zellen, kann auf eine Kreuzreaktion beider Antikörper zurückgeführt werden. Da die stärksten Signale stets in der Zellperipherie auftraten, ist ebenso vorstellbar, dass bei der Sphäroplastierung der Zellen die Zellwand nicht genügend abgebaut wurde, sodass die eingesetzten Antikörper unspezifisch an die Zellwand gebunden wurden. Um auszuschließen, dass die sekundären, FITC-gekoppelten Antikörper unspezifisch mit den fixierten Zellen interagierten, wurden zunächst die bereits präparierten Zellen direkt mit sekundärem, FITC-gekoppelten anti-rabbit-Antikörper inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es waren in keiner Probe Fluoreszenzsignale zu erkennen (nicht gezeigt), sodass eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers ausgeschlossen werden kann.

In einem zweiten Versuch zur Detektion von K28 bzw. K28 α mittels IIF wurde das Protokoll zur Präparation der Zellen dahingehend verändert, dass die Sphäroplastierung der Zellen vor der Inkubation mit K28-Toxinkonzentrat erfolgte. Diese Vorgehensweise bot mehrere Vorteile. Zum einen wurde ein möglicherweise ineffizienter Zellwandverdau der schon fixierten Zellen umgangen, zum anderen zeigten frühere Untersuchungen, dass

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, zeigten sowohl mit K28 behandelte, als auch unbehandelte Sphäroplasten mit beiden Antikörpern starke Fluoreszenzsignale. Die Fluoreszenz war in allen Fällen gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt und am stärksten in der Peripherie der Zellen. Da die Zellen bei diesem Versuch vor der Fixierung sphäroplastiert wurden, ist davon auszugehen, dass die Zellwand zum größten Teil verdaut wurde, sodass die geschlossene „ringförmige“ Fluoreszenz in der Zellperipherie nicht auf unspezifisch an Zellwandreste gebundene Antikörper zurückgeführt werden kann. Vielmehr muss angenommen werden, dass die Fluoreszenzsignale aus Kreuzreaktionen der primären anti-K28 α - und anti-K28-Antikörper resultierten.

Vereinzelt waren mit einer erhöhten Vergrößerung bei den K28-behandelten und mit anti-K28 α markierten Sphäroplasten interne Strukturen zu erkennen (Abbildung 22, rote Pfeile). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich dabei um die Kernmembran handelte, die aufgrund der Präparation ein untypisches Erscheinungsbild aufwies.

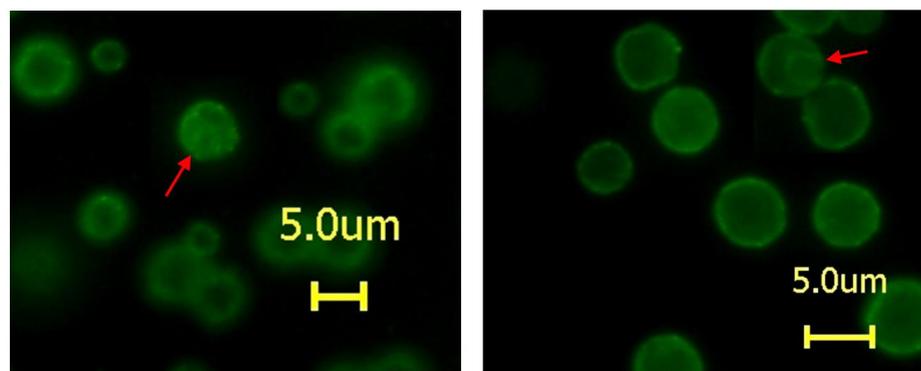


Abbildung 22: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie K28-behandelter Sphäroplasten des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 zum intrazellulären Nachweis von K28 α . 1×10^7 Zellen des Stammes BY4742 wurden sphäroplastiert und 5 h bei 20 °C und 110 rpm mit 20 % 100x K28-Konzentrat in Inkubationspuffer inkubiert. Die Sphäroplasten wurden anschließend fixiert und nach Permeabilisation mit anti-K28 α -Antikörper (1:10) auf Poly-Lysin-beschichteten Objektträgern inkubiert. Der sekundäre, FITC-gekoppelte anti-rabbit-Antikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Messbalken: 5 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Pfeile: intrazelluläre, fluoreszierende Strukturen

Da der Nachweis von K28 bzw. K28 α in den bisherigen Versuchen nicht erfolgreich war und die Antikörper starke Kreuzreaktionen aufwiesen, wurden verschiedene Parameter des Protokolls zur IIF (Roberts *et al.* 1991) verändert. So wurde Methanol statt Formaldehyd als Fixierungsreagenz und in weiteren Versuchen Aceton statt SDS zur Permeabilisierung verwendet. Des Weiteren wurden die Antikörperfärbungen nicht auf Poly-Lysin-beschichteten Objektträgern, sondern im Reaktionsgefäß durchgeführt, um eine bessere Diffusion der Antikörper in die Zellen zu ermöglichen. Sowohl Toxin-behandelte Hefezellen als auch Sphäroplasten wurden auf diese Arten präpariert. Keine der Parameteränderungen führte zu einem verbesserten IIF-Ergebnis (nicht gezeigt). Vielmehr waren in vielen Fällen keine

Fluoreszenzsignale zu sehen, womit davon auszugehen ist, dass das Originalprotokoll von Roberts *et al.* (1991) am besten zur IIF geeignet ist.

In den oben aufgeführten IIF-Versuchen, bei denen Zellen bzw. Sphäroplasten mit K28-Toxinkonzentrat behandelt wurden, war ein intrazellulärer Nachweis von K28 bzw. K28 α nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt versucht, K28 α nach intrazellulärer Expression des K28 α -Letalkonstrukts präpro α mittels IIF zu detektieren und die Lokalisation zu bestimmen. Zwar zeigten die verwendeten Antikörper starke Kreuzreaktionen, jedoch lag es im Bereich des Möglichen, dass durch eine Galaktose-induzierte Expression genügend K28 α -Moleküle in der Zelle vorlagen, die die aus den Kreuzreaktionen resultierenden Fluoreszenzsignale überdecken könnten. Zur Anwendung kam in diesem Versuch der unter Punkt 3.1.4 beschriebene *S. cerevisiae* Stamm BY4742 p06pp α , bei dem das Konstrukt präpro α unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors im Hefegenom integriert vorlag. Nach einer Expressionszeit von 12 h wurden die Zellen geerntet, nach dem Protokoll von Roberts *et al.* (1991) zur IIF präpariert und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abbildung 23). Als primärer Antikörper wurde anti-K28 α verwendet.

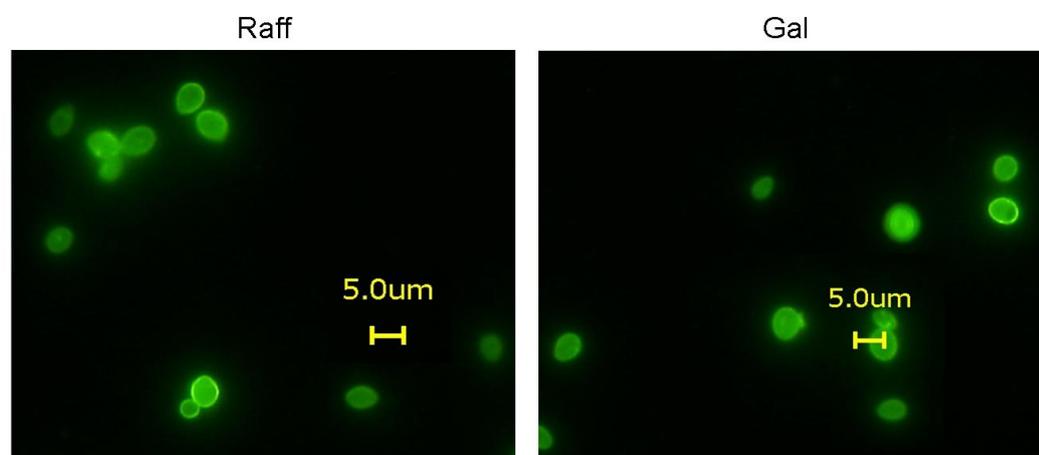


Abbildung 23: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie von BY4742 p06pp α zur intrazellulären Detektion von K28 α . Zellen des Stammes BY4742 pp06pp α wurden 12 h in Ura d/o Raffinose- (Raff) bzw. zur Expression von präpro α 12 h in Ura d/o Galaktose-Medium (Gal) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, sphäroplastierte und nach Permeabilisation mit anti-K28 α -Antikörper (1:10) auf Poly-Lysin-beschichteten Objektträgern inkubiert. Der sekundäre, FITC-gekoppelte anti-rabbit-Antikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Messbalken: 5 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtungszeit: 1/20s

Abbildung 23 lässt erkennen, dass sowohl nicht-induzierte als auch induzierte Zellen die gleichen Fluoreszenzsignale zeigten. Es war in beiden Fällen eine über die Zellen gleichmäßig verteilte Fluoreszenz sowie eine stärker fluoreszierende Zellperipherie zu erkennen. Die Signale entsprechen dabei den vorherigen Versuchen, bei denen Zellen

zunächst mit K28-Toxin behandelt und dann zur IIF eingesetzt wurden. Das Ergebnis unterstreicht die Vermutung, wonach die Fluoreszenzsignale auf Kreuzreaktionen des primären Antikörpers zurückzuführen sind. Definierte intrazelluläre Signale von K28 α , die durch eine Überexpression von präpro α erwartet wurden, waren nicht zu erkennen.

Eine Erklärung für das Ausbleiben der K28 α -Signale nach intrazellulärer Expression von präpro α lag in einer möglicherweise zu starken Toxizität des Konstrukts präpro α begründet. Es ist vorstellbar, dass bei einem zu schnellen Zelltod die bis dahin gebildete Menge an K28 α -Molekülen nicht für einen Nachweis mittels IIF ausreichte. Aus diesem Grund wurde auf Deletionsmutanten zurückgegriffen, die auf von außen appliziertes Toxin im MBA-Test resistent reagieren. Sind die Zellen auch bei intrazellulärer Expression vor der Wirkung von K28 α geschützt, kann möglicherweise eine ausreichende Menge an K28 α -Molekülen gebildet werden, die mittels IIF nachweisbar ist. Bei den verwendeten Deletionsmutanten handelte es sich um die von Reiter 2004 identifizierten, K28-resistenten Mutanten $\Delta elm1$, $\Delta cse2$ und $\Delta ssn8$. Um einen Vergleich zu dem Stamm BY4742 p06pp α zu ermöglichen, wurden die Stämme mit dem *Stul*-linearisierten Plasmid pRS306-pp α (siehe 3.1.4) transformiert. Auch nach mehreren Versuchen konnten keine Transformanten erhalten werden, weswegen die Stämme mit dem „multicopy“-Plasmid pESC^{Leu}-pp α transformiert wurden. Zur Herstellung des Plasmids wurde der Vektor pRS316-pp α mittels *NotI/SacI*-Verdau geschnitten. Das Insert, bestehend aus der Expressionskassette P_{GAL1} -pp α - T_{CYC1} wurde in den ebenfalls *NotI/SacI*-geschnittenen Vektor pESC^{Leu} ligiert. Zunächst wurde mittels seriellen Verdünnungstest überprüft, ob die Mutanten auch gegen eine intrazelluläre Expression von präpro α resistent gegenüber dem Toxin sind (Abbildung 24).

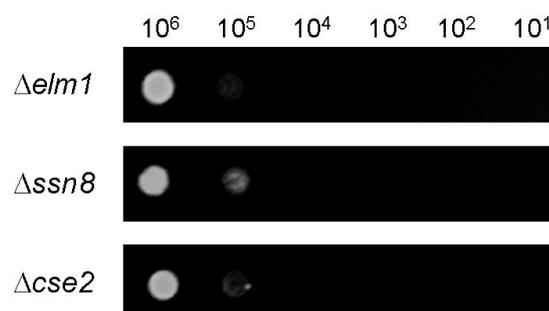


Abbildung 24: Serieller Verdünnungstest zur Überprüfung der Toxizität von präpro α in den Deletionsmutanten $\Delta elm1$, $\Delta cse2$ und $\Delta ssn8$. Die Mutanten wurden mit dem Plasmid pESC^{Leu}-pp α transformiert.

In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass alle Deletionsmutanten ein Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10^5 aufwiesen. Die Resistenz der Mutanten gegenüber exogen appliziertem Toxin trat somit nicht bei intrazellulärer Expression von präpro α auf.

Trotz der ausgebliebenen Resistenz wurde versucht, in den Deletionsmutanten K28 α mittels IIF zu detektieren. Die Zellen wurden nach einer Galaktose-induzierten Expressionszeit von 12 h geerntet, zur IIF präpariert und im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abbildung 25). Als primärer Antikörper wurde anti-K28 α verwendet. Die Versuche mussten mehrmals wiederholt werden, da die Fluoreszenzsignale oft diffus und nur sehr schwach ausgeprägt waren. Die Präparation der in Abbildung 25 zu sehenden Zellen beinhaltete daher einen 2-stündigen Sphäroplastierungsschritt.

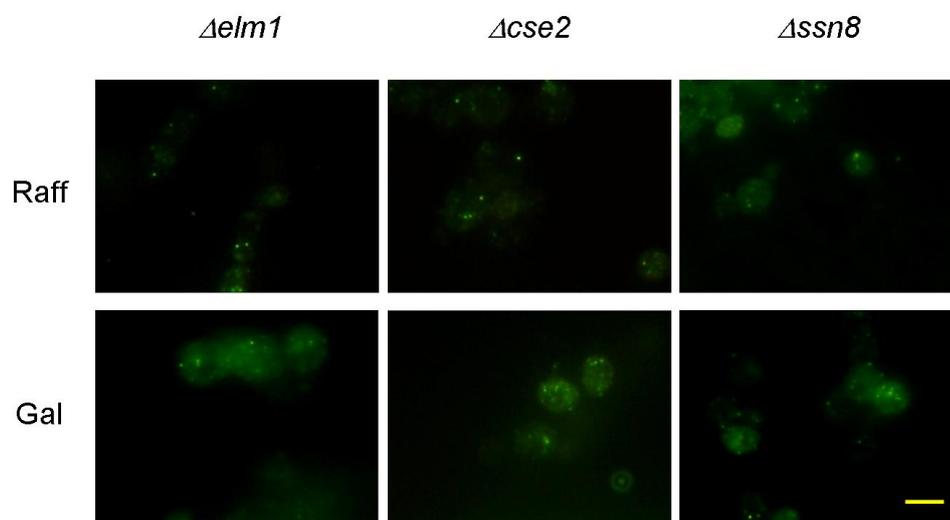


Abbildung 25: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie der BY4742 Mutanten $\Delta elm1$, $\Delta cse2$ und $\Delta ssn8$ nach intrazellulärer Expression von präpro α . Zellen der mit dem Vektor pESC^{Leu}-pp α transformierten BY4742-Deletionsmutanten $\Delta elm1$, $\Delta cse2$ und $\Delta ssn8$ wurden 12 h in Ura d/o Raffinose- (Raff) bzw. zur Expression von präpro α 12 h in Ura d/o Galaktose-Medium (Gal) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend fixiert, 2 h sphäroplasiert und nach Permeabilisation mit anti-K28 α -Antikörper (1:10) auf Poly-Lysin-beschichteten Objektträgern inkubiert. Der sekundäre, FITC-gekoppelte anti-rabbit-Antikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Messbalken: 5 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtungszeiten: 1/4,5-1/8s

Trotz mehrerer Versuche und einer erhöhten Sphäroplastierungszeit zeigten die Fluoreszenzaufnahmen eine unbefriedigende Qualität. Die in dem Versuch eingesetzten *S. cerevisiae* Mutanten scheinen insgesamt zur IIF eher ungeeignet. Es zeigte sich eine diffuse Fluoreszenz über die gesamten Zellen mit einzelnen punktuellen Signalen. Da diese Signale auch in den nicht-induzierten Kulturen zu sehen waren, kann es sich dabei nicht um K28 α handeln. Die Detektion der toxischen K28-Untereinheit blieb somit auch nach intrazellulärer Expression von präpro α in den Deletionsmutanten $\Delta elm1$, $\Delta cse2$ und $\Delta ssn8$ erfolglos.

Insgesamt erwies sich die IIF als keine geeignete Methode zur Detektion und Lokalisationsbestimmung von K28 α . Sowohl Zellen, die mit K28-Toxinkonzentrat behandelt wurden, als auch Zellen, die intrazellulär das Letalkonstrukt präpro α exprimierten, lieferten keine eindeutigen Fluoreszenzsignale der toxischen K28-Untereinheit. Als Hauptproblem erwies sich die Qualität der eingesetzten primären K28- und K28 α -Antikörper. Beide Antikörper zeigten starke Kreuzreaktionen, sodass auch unbehandelte bzw. nicht-induzierte Zellen starke Fluoreszenzsignale aufwiesen. Es ist somit vorstellbar, dass Signale des Toxins durch die starken Kreuzreaktionen der Antikörper überlagert wurden. Des Weiteren kann das Ausbleiben von Fluoreszenzsignalen von K28 α auf eine zu geringe Menge der Epitope zurückgeführt werden. Zellen, die mit K28 behandelt wurden, nehmen möglicherweise zu wenige Toxinmoleküle auf, um sie mittels IIF nachzuweisen. Bei intrazellulärer Überexpression von präpro α ist denkbar, dass die Zellen durch das Toxin zu schnell absterben, bevor eine ausreichende, detektierbare Menge an Toxinmolekülen gebildet werden konnte.

3.1.4 Lokalisationsbestimmung von K28 und K28 α mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie (IEM)

Da es nicht möglich war, die nukleäre Lokalisation von K28 α weder mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie noch durch Fusion mit mRFP nachzuweisen, wurde versucht, die Lokalisation mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie (IEM) zu bestimmen. Die Versuche dazu wurden am University Medical Centre Utrecht in der Arbeitsgruppe von Fulvio Reggiori durchgeführt.

Bei der IEM werden zunächst Ultradünnschnitte von Hefezellen angefertigt, die nach Inkubation mit einem primären Antikörper mit einem Gold-gekoppelten, sekundären Antikörper bzw. mit Protein A-Gold inkubiert werden. Bindet der primäre Antikörper an ein Epitop, so ist der Goldpartikel im elektronenmikroskopischen Bild als Punkt sichtbar. Da erfahrungsgemäß Antikörper, die gegen ein V5-„Tag“ gerichtet sind, sehr gut zur IEM geeignet sind (Reggiori, pers. Mitteilung) und die zum Zeitpunkt der Versuche zur Verfügung gestandenen K28- und K28 α -Antikörper in Western-Analysen Kreuzreaktionen im hochmolekularen Bereich zeigten, wurden verschiedene V5-„getaggte“ K28-Varianten hergestellt. Da in der vorliegenden Arbeit primär die Lokalisation von K28 α aufgeklärt werden sollte, wurde zunächst ein K28-Vollängenkonstrukt erstellt (Abbildung 27), dem zwischen pro- und α -Region ein V5-„Tag“ eingefügt wurde. Dazu wurde das bereits bestehende Konstrukt ppV5 α durch *Xho*I/*Bam*HI-Verdau aus dem Vektor pYES2.1-ppV5 α ausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Xho*I und *Bam*HI verdauten Vektor pPGK-M28I inkloniert. Der so erstellte Vektor pPGK-K28V5 α wurde zur Transformation des

S. cerevisiae Stammes S86c verwendet und dieser anschließend auf Killeraktivität getestet, indem 1×10^7 Zellen auf MBA-Platten aufgetropft wurden, in die der K28-sensitive Stamm BY4742 pYES2.1-leer eingebettet war. Parallel dazu wurden 1×10^7 Zellen des Stammes S86c pPGK-M28I, der wildtypisches K28-Toxin sezerniert, ebenfalls aufgetropft (Abbildung 26).

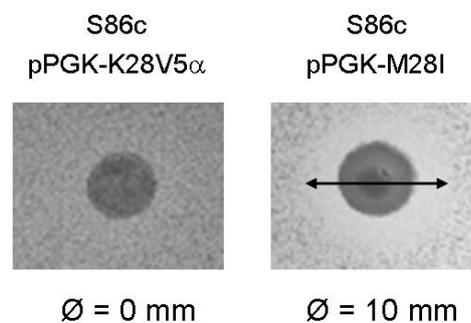


Abbildung 26: MBA-Test zur Untersuchung der Toxizität der K28-Variante K28V5 α . Der Vektor pPGK-K28V5 α wurde in den *S. cerevisiae* Stamm S86c transformiert und von diesem 1×10^7 Zellen auf Ura d/o MBA-Platten aufgetropft. Als sensibler Hefestamm waren 1×10^6 Zellen des Stammes BY4742 pYES2.1-leer im Agar eingebettet. Zur Kontrolle wurden ebenfalls 1×10^7 Zellen des Killerstammes S86c pPGK-M28I aufgetropft.

Der MBA zeigte, dass das N-terminal der K28 α -Sequenz V5-„getaggte“ Volllängentoxin keine Killeraktivität besaß, da kein Hemmhof zu erkennen war. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Arbeiten, in denen versucht wurde, Volllängentoxinvarianten von K28 zu sezernieren, bei denen ein „Tag“ N- oder C-terminal der K28 α -Sequenz eingefügt wurde. Alle daraus hergestellten Toxinkonzentrate zeigten keine Killeraktivität gegenüber sensiblen Hefezellen (Reiter 2004). Für die Lokalisationsbestimmung mittels IEM ist es dennoch äußerst wichtig, dass aktives Toxin eingesetzt wird, da nur so eine korrekte terminale Lokalisation gewährleistet ist.

Um dennoch Lokalisationsstudien des Volllängentoxins mittels IEM durchzuführen, wurden zwei weitere K28-Varianten erstellt, bei denen das V5-„Tag“ C-terminal an die K28 β -Sequenz angefügt wurde (Abbildung 27). Die terminale Lokalisation von K28 α konnte mit diesen K28-Varianten nicht bestimmt werden, da α - und β -Untereinheit im Zytosol voneinander getrennt werden. Vielmehr sollte in diesem Versuchsteil die Lokalisation des vollständigen Toxins im Sekretionsweg der behandelten Zellen sichtbar gemacht werden. Bei einer erfolgreichen Detektion von V5-„getaggttem“ K28 kann in anschließenden Versuchen die Inkubationszeit der Zellen mit Toxinkonzentrat variiert werden, wodurch der retrograde Transport des Toxins von Plasmamembran über Golgi-Apparat und ER ins Zytosol und schließlich in den Zellkern verfolgt werden kann.

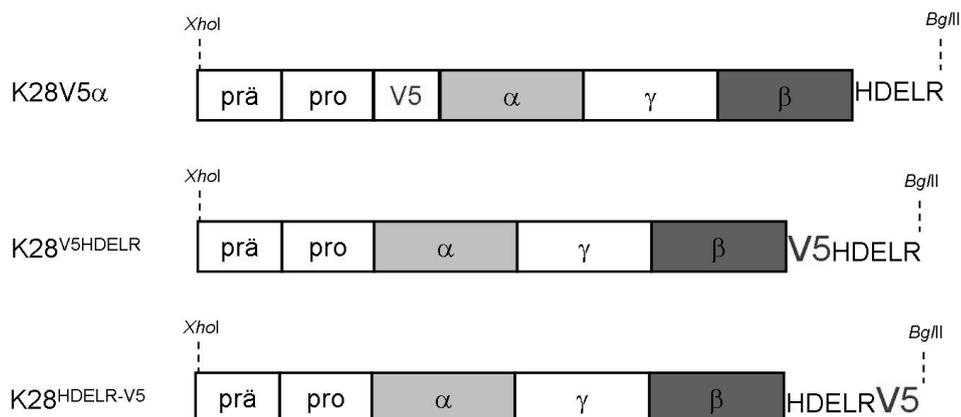


Abbildung 27: K28-Varianten, die zum IEM-Nachweis von K28 α bzw. dem reifen Toxin erstellt wurden. Alle Konstrukte wurden nach *XhoI/BglII*-Verdau in den ebenfalls *XhoI/BglII* verdauten Vektor pPGK-M28I kloniert und in den *S. cerevisiae* Stamm S86c transformiert.

Bei dem Konstrukt K28^{V5HDEL R} befindet sich die V5-Sequenz vor dem HDEL R-Motiv, das Konstrukt K28^{HDEL R-V5} trägt das V5-„Tag“ C-terminal des Motivs (Abbildung 27). Beide Konstrukte wurden durch PCR mit dem Plasmid pPGK-M28I als Template hergestellt. Als 5'-Primer wurde in beiden Fällen Primer 1 verwendet. Die V5-Sequenz wurde dabei durch die jeweiligen 3'-Primer 16 (K28^{V5HDEL R}) bzw. 17 (K28^{HDEL RV5}) angefügt. Das Amplifikat K28^{V5HDEL R} wurde in den Vektor pSTBlue-1, K28^{HDEL RV5} in den Vektor pYES2.1 zwischenkloniert und sequenziert. Die Plasmid-DNA von korrekt sequenzierten Klonen wurde mit *XhoI* und *BglII* geschnitten und in den ebenfalls *XhoI/BglII*-verdauten Vektor pPGK-M28I ligiert. Die so konstruierten Plasmide pPGK-K28^{V5HDEL R} und pPGK-K28^{HDEL R-V5} wurden zur Transformation des *S. cerevisiae* Stammes S86c eingesetzt. Der Test auf Killeraktivität erfolgte wie zuvor für den Stamm S86c pPGK-K28V5 α beschrieben im MBA (Abbildung 28).

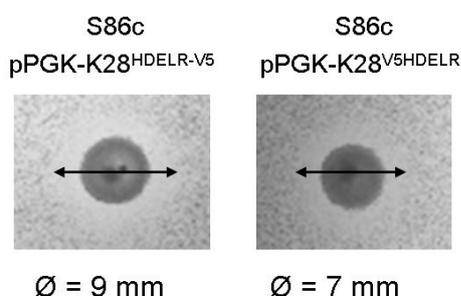


Abbildung 28: MBA-Test zur Untersuchung der Toxizität der K28-Varianten K28^{HDEL R-V5} und K28^{V5HDEL R}. Die Vektoren pPGK-K28^{HDEL R-V5} und pPGK-K28^{V5HDEL R} wurden in den *S. cerevisiae* Stamm S86c transformiert und von diesen jeweils 1×10^7 Zellen auf Ura d/o MBA-Platten aufgetropft. Als sensibler Hefestamm waren jeweils 1×10^6 Zellen des Stammes BY4742 pYES2.1-leer im Agar eingebettet.

Beide Toxine führten zu einem Hemmhof, wirkten also noch letal auf sensitive Zellen. Auffallend ist dabei, dass der Hemmhof des Toxins K28^{HDEL^R-V5} mit 9 mm geringfügig größer war als der von K28^{V5HDEL^R} (7 mm). Die Beobachtung bestätigt Ergebnisse aus früheren Arbeiten. Bei C-terminaler Fusion des Volllängentoxins mit einem Strep- oder FLAG-„Tag“ waren auch in diesen Fällen die Toxine aktiver, wenn das „Tag“ C-terminal des HDEL^R-Motivs angefügt wurde (Cappel 2006, Guida 2007). Da die Toxinvariante K28^{HDEL^R-V5} eine größere Aktivität aufwies, wurde auch diese zur IEM eingesetzt.

Da bei den etwa 200 nm dicken Ultradünnschnitten nur ein Bruchteil des Volumens einer Hefezelle erfasst wird, liegt auch der Anteil der mittels IEM detektierbaren Epitope im Vergleich zur Gesamtmenge bei unter 1 % (Reggiori, pers. Mitteilung). Aufgrund dessen wurde zunächst mittels Western-Analyse abgeschätzt, ob die Menge an aufgenommenem K28^{HDEL^R-V5}-Toxin zur Detektion mittels IEM ausreicht. Als Vergleich diente der *S. cerevisiae* Stamm AVY017, der eine V5-„getaggte“ Variante von Sec7mCherry exprimiert. Dieses Fusionsprotein ist mittels IEM gut detektierbar (Reggiori, pers. Mitteilung). Zeigt K28^{HDEL^R-V5} in Rohextrakten von behandelten Zellen ein mindestens gleich starkes Signal wie Sec7mCherryV5 im Western-Blot, so ist auch die Detektion von K28^{HDEL^R-V5} mittels IEM erfolgversprechend.

Zum Vergleich der Signalstärken wurden 1×10^8 Zellen einer BY4742 Übernachtskultur in Inkubationspuffer resuspendiert und 135 min mit $100 \times$ K28^{HDEL^R-V5}-Toxinkonzentrat inkubiert. Zum Entfernen von an der Zellwand gebundenem Toxin wurden die Zellen zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen und mittels Glasperlenaufschluss der Rohextrakt gewonnen. Der Stamm AVY017, der konstitutiv Sec7mCherryV5 exprimiert, besitzt aufgrund mutierter *ARF*-Gene einen Wachstumsdefekt und wurde daher fünf Tage bei 24 °C in SC-Medium kultiviert (Reggiori, pers. Mitteilung) und ebenfalls 1×10^8 Zellen zum Glasperlenaufschluss eingesetzt. Die SDS-PAGE fand unter nicht-reduzierenden Bedingungen statt, zur Entwicklung des Western-Blots wurde ein primärer V5-Antikörper (1:10.000) eingesetzt (Abbildung 29).

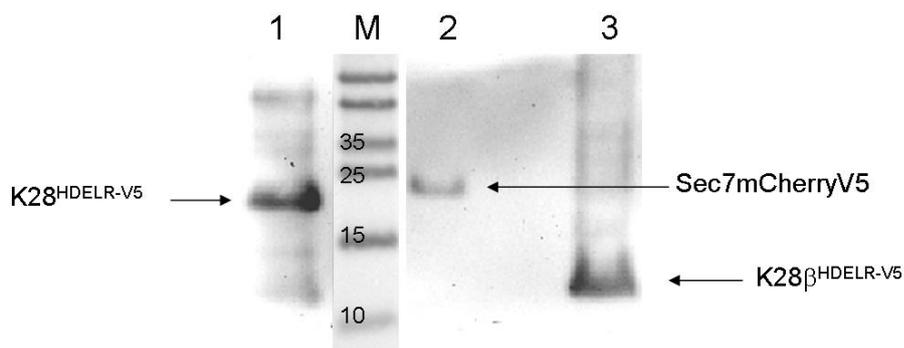


Abbildung 29: Western-Analyse zum Vergleich der Signalstärken von Sec7mCherryV5 und aufgenommenem K28^{HDEL-R-V5}-Toxin. 1×10^8 Zellen einer BY4742 Übernachtskultur wurden in Inkubationspuffer resuspendiert, 135 min mit $100 \times$ K28^{HDEL-R-V5}-Toxinkonzentrat inkubiert und nach einem zweimaligen Waschschrift der Rohextrakt durch Glasperlenaufschluss gewonnen. Zur Gewinnung des Rohextraktes des Stammes AVY017 wurden die Zellen 5 Tage bei 24°C kultiviert und 1×10^8 Zellen zum Glasperlenaufschluss eingesetzt. Die Entwicklung des Western-Blots erfolgte durch einen primären V5-Antikörper (1:10.000).

- 1: Positivkontrolle, K28^{HDEL-R-V5}-Toxinkonzentrat
- 2: Zellaufschluss AVY017
- 3: Zellaufschluss BY4742 nach 135 min Inkubation mit $100 \times$ K28^{HDEL-R-V5}-Toxinkonzentrat

In der Western-Analyse ist das V5-Signal des Vergleichsprotein in Spur 2 zu erkennen. Die Signalstärke von K28 β ^{HDEL-R-V5} bei etwa 11 kDa in Spur 3 übersteigt die des Vergleichsprotein deutlich. Das geringere Molekulargewicht im Vergleich zur Positivkontrolle ist auf die Trennung von K28 α - und K28 β -Untereinheit im Zytosol der Zielzellen zurückzuführen. Aufgrund der hohen Signalstärke von K28 β ^{HDEL-R-V5} konnte davon ausgegangen werden, dass die aufgenommene Toxinmenge zur Detektion mittels IEM ausreicht.

Zur Detektion und Bestimmung der Lokalisation von K28^{HDEL-R-V5} wurden 1×10^8 Zellen einer Übernachtskultur des K28-sensitiven *S. cerevisiae* Stammes BY4742 in Inkubationspuffer resuspendiert und 120 min mit $100 \times$ K28^{HDEL-R-V5}-Toxinkonzentrat inkubiert. Ebenso wurde ein Kontrollansatz angefertigt, bei dem die Zellen lediglich in Inkubationspuffer ohne Toxinkonzentrat 120 min belassen wurden. Die Zellen wurden zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen, fixiert und in Gelatine eingebettet. Von den Gelatineblöckchen wurden Kryoschnitte angefertigt, die zur Immunogoldfärbung verwendet wurden. Dazu wurden die Ultradünnschnitte zunächst mit einem monoklonalen V5-Antikörper und anschließend mit Protein A-gekoppelten Goldpartikeln inkubiert. Die Zellen wurden schließlich im Transmissionselektronenmikroskop betrachtet. Es zeigten sich in den IEM-Aufnahmen keine Signale der Goldpartikel (nicht gezeigt). Die Detektion von K28^{HDEL-R-V5} in behandelten Hefezellen war somit nicht erfolgreich.

Da es nicht möglich war, „von außen“ aufgenommenes Toxin in Hefezellen mittels IEM zu detektieren, wurde als weitere Strategie auf ein intrazellulär exprimiertes K28 α -Letalkonstrukt zurückgegriffen. Auch bei diesem Versuch fand die zu Beginn des Kapitels erwähnte V5-

„getaggte“ K28 α -Variante ppV5 α Verwendung. Das Konstrukt lag unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors im Hefeexpressionsvektor pYES2.1 vor und zeigte im seriellen Verdünnungstest im Vergleich zu dem wildtypischen Konstrukt präpro α zwar einen verminderten aber dennoch toxischen Effekt im *S. cerevisiae* Stamm BY4742 (Kelkel 2009). Bei dem Vektor pYES2.1 handelt es sich um einen „multicopy“-Vektor, der auf dem natürlichen Hefepiasmid 2 μ basiert, so dass pro Zelle die Anzahl an Plasmiden zwischen 60 und 100 schwankt (Shaw *et al.* 1993). Die daraus resultierende stark unterschiedliche Expressionsstärke der einzelnen Zellen macht eine an die IEM anschließende statistische Auswertung schwierig. Aus diesem Grund wurde das Konstrukt ppV5 α zusätzlich in einen Zentromervektor kloniert. Diese Vektoren liegen mit einer Anzahl von durchschnittlich 1 bis 2 Plasmiden (Tschumper & Carbon 1983) pro Hefezelle vor, so dass die Genkopien und somit die Expressionslevel nahezu gleich sind. Als Zentromervektor fand das Plasmid pRS316 mit zusätzlicher Promotorsequenz *P_{GAL1}* und Terminatorsequenz *CYC1* Verwendung. Das aus pYES2.1-ppV5 α mit *EcoRI/BglII* verdaute Insert ppV5 α wurde in den *EcoRI/BamHI* verdauten Vektor pRS316-Erd2.93 ligiert und zur Transformation des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 eingesetzt. Da die Menge an Zentromervektoren in einer Zelle um fast das hundertfache niedriger ist als bei „multicopy“-Vektoren, wurde zunächst im seriellen Verdünnungsassay getestet, ob die mit dem Zentromervektor pRS316-ppV5 α transformierten Hefen unter induktiven Bedingungen ebenfalls einen Selbstkillerphänotyp ausprägen.

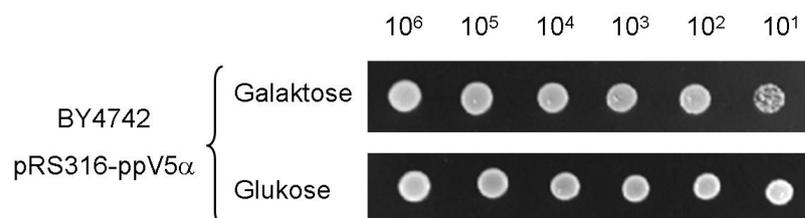


Abbildung 30: Wachstumstest zur Bestimmung der Toxizität des ppV5 α -Konstrukts im Zentromervektor pRS316. Der *S. cerevisiae* Stamm BY4742 wurde mit dem Plasmid pRS316-ppV5 α transformiert und das Wachstum im seriellen Verdünnungstest untersucht. Die Expression von ppV5 α stand dabei unter Kontrolle des *P_{GAL1}*-Promotors.

Die Zellen wuchsen im seriellen Verdünnungstest auch unter induktiven Bedingungen bis zur höchsten Verdünnungsstufe 10¹ (Abbildung 30), womit gezeigt wurde, dass das Konstrukt ppV5 α in einem Zentromervektor keine toxische Wirkung mehr entfaltet. Dennoch wurden zum Vergleich sowohl der BY4742-Stamm mit dem „multicopy“-Plasmid pYES2.1-ppV5 α als auch der mit dem Zentromervektor pRS316-ppV5 α transformierte Stamm in der IEM getestet.

Zunächst musste auch in diesen Stämmen die Signalstärke von ppV5 α im Western-Blot überprüft werden, um abzuschätzen, ob ppV5 α mittels IEM detektierbar ist. Dazu wurden die *S. cerevisiae* Stämme BY4742 pYES2.1-ppV5 α und BY4742 pRS316-ppV5 α ü. N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert und zur Induktion der Expression mit 20 % Galaktose-Stammlösung (Endkonzentration 2 %) versetzt. In zeitlichen Abständen von zwei Stunden wurden über einen Zeitraum von 10 Stunden jeweils 1×10^8 Zellen geerntet und zum S80-Schnellaufschluss eingesetzt. Die Rohextrakte wurden mittels SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und die V5-„getaggt“ K28 α -Varianten mittels V5-Antikörper in einer Western-Analyse detektiert (Abbildung 31).

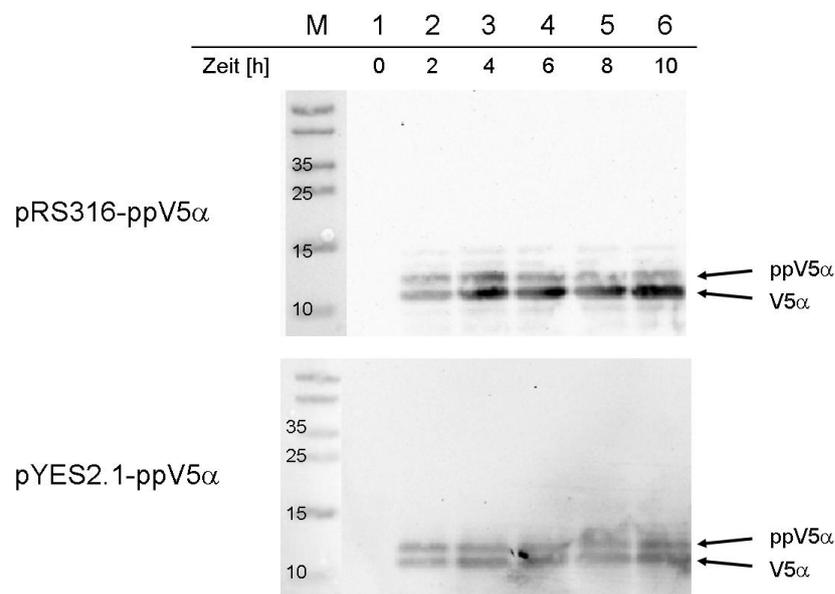
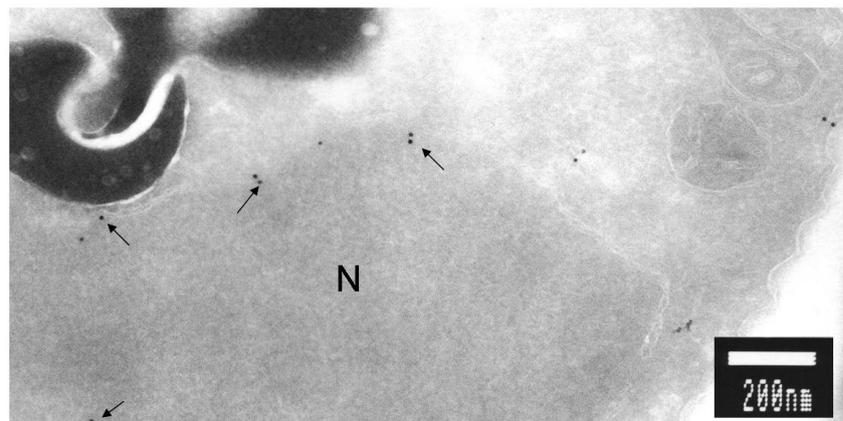


Abbildung 31: Western-Analyse zum Nachweis der Expression von ppV5 α im „multicopy“-Vektor pYES2.1 und im Zentromervektor pRS316. Die Vektoren wurden in den *S. cerevisiae* Stamm BY4742 transformiert und diese ü. N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von 20 % Galaktose (Endkonzentration 2 %) induziert und nach den angegebenen Zeitpunkten (0 bis 10 h) jeweils 1×10^8 Zellen geerntet. Die Rohextrakte wurden mittels S80-Schnellaufschluss erhalten. In den Blots nachweisbar waren stets die unprozessierte Form ppV5 α sowie die im Sekretionsweg prozessierte Form V5 α .

Die Western-Analysen zeigten sowohl im Falle des „multicopy“-Plasmids pYES2.1-ppV5 α , als auch im Falle des Zentromervektors pRS316-ppV5 α schon nach einer Expressionszeit von nur zwei Stunden deutliche Signale des V5-„Tags“. Es waren in allen Fällen mehrere Banden erkennbar, die den einzelnen Prozessierungsstufen von ppV5 α zugeordnet werden konnten. Da auch hier die Signale stärker waren, als die des Vergleichsprotein Sec7mCherryV5 in Abbildung 29, konnte davon ausgegangen werden, dass die V5-„getaggt“ K28 α -Varianten auch im Elektronenmikroskop nach Immunogoldfärbung detektierbar sein sollten.

Zur Detektion der ppV5 α -Konstrukte mittels IEM wurden Zellen der Hefestämme BY4742 pYES2.1-ppV5 α und BY4742 pRS316-ppV5 nach einer Expressionszeit von 2 h gerntet und analog zu den K28-behandelten Zellen für die IEM präpariert. Generell fiel auf, dass nur ein äußerst geringer Anteil an Zellen Signale der Goldpartikel zeigte. Eine statistische Auswertung, die grundsätzlich zur Lokalisationsbestimmung mittels IEM nötig ist, war somit nicht möglich. Abbildung 32 zeigt jeweils eine Einzelzelle der Stämme BY4742 pYES2.1-ppV5 α und BY4742 pRS316-ppV5 α , bei denen Signale detektiert wurden.

A) pRS316-ppV5a



B) pYES-ppV5a

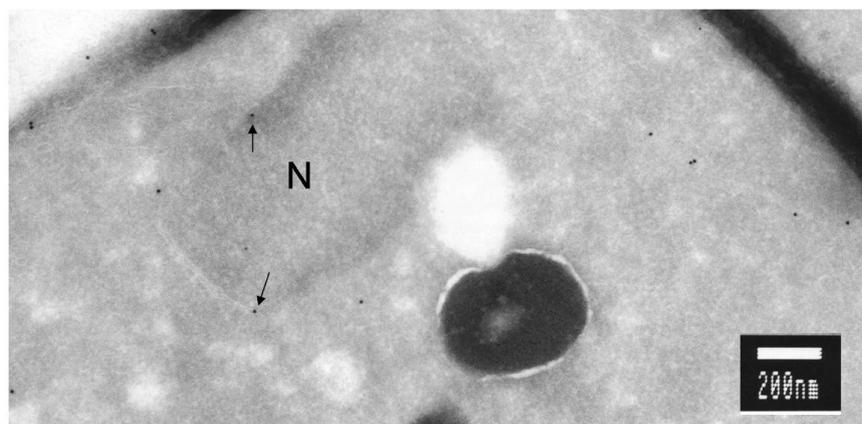


Abbildung 32: Immunogold-Elektronenmikroskopie zur intrazellulären Detektion von ppV5 α . Die Hefestämme BY4742 pYES2.1-ppV5 α und BY4742 pRS316-ppV5 α wurden ü. N. in *ura* Raffinose-Medium kultiviert und die Expression von ppV5 α durch Zugabe einer Galaktoseestammlösung (Endkonzentration 2 %) induziert. Nach einer 2-stündigen Expression wurden die Zellen zur IEM präpariert. Als primärer Antikörper wurde anti-V5 eingesetzt. Die Detektion erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop JEM-1010 (JEOL).

N: Nukleus; Pfeile: Signale, die eine Lokalisation in der Kernmembran andeuten

Abbildung 32 A zeigt eine Zelle, die ppV5 α durch den Zentromervektor pRS316 exprimiert. In Abbildung 32 B ist eine Zelle zu sehen, bei der die ppV5 α -Expression durch den

„multicopy“-Vektor pYES2.1 erfolgte. In beiden Fällen waren eindeutige Signale der Goldpartikel zu erkennen. Ein Großteil der Goldpartikel lokalisierte dabei um den Nukleus, möglicherweise in der Kernmembran (Pfeile). Die restlichen Goldpartikel waren möglicherweise im Golgi-Apparat oder ER lokalisiert (Reggiori, pers. Mitteilung), jedoch war eine exakte Bestimmung der Lokalisierung aufgrund der Qualität der TEM-Aufnahmen schwierig. In keiner der Zellen, die untersucht wurden, waren Goldpartikel im Nukleus zu sehen. Eine nukleäre Lokalisation der V5-„getaggtten“ K28 α -Variante konnte somit mittels IEM nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnte mittels IEM die terminale Lokalisation von K28 bzw. K28 α nicht eindeutig geklärt werden. Zellen, die mit K28^{HDELR-V5} behandelt wurden, zeigten keine Signale der Goldpartikel, was auf eine zu geringe Anzahl an Toxinmolekülen in den Zellen zurückgeführt werden kann. Ebenso konnte die Lokalisation von K28 α durch intrazelluläre Expression V5-„getaggtter“ K28 α -Varianten mittels IEM nicht eindeutig geklärt werden, da die Anzahl an Zellen, die Signale zeigten, zu gering war, um statistisch abgesicherte Aussagen zu treffen.

Im Verlauf der Arbeit wurde ein Antikörper gegen K28 α (anti-K28 α) hergestellt, womit sich auch eine weitere Strategie zur elektronenmikroskopischen Detektion von K28 α eröffnete. Da es für eine statistische Auswertung von Vorteil ist, wenn das Expressionslevel in den einzelnen Zellen gleich ist, wurde die Sequenz von präpro α in das Hefegenom integriert, womit, anders als bei „multicopy“- oder Zentromervektoren, in jeder Hefe nur eine Genkopie vorlag. Dazu wurde die präpro α -Expressionskassette, bestehend aus den Sequenzen P_{GAL1} , pp α und $CYC1$ aus dem Plasmid pRS316-pp α durch Restriktionsverdau mit *SacI* und *NotI* ausgeschnitten und in den *SacI/NotI*-verdauten, integrativen Vektor pRS306 inkloniert. Das so entstandene Plasmid pRS306-pp α wurde nach Linearisierung durch *StuI* zur Transformation des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 verwendet, wo der Vektor in die genomische Sequenz des $URA3$ -Gens integrierte. Der Stamm trägt im Weiteren die Bezeichnung BY4742 p06pp α . Zunächst wurde mittels seriellen Verdünnungstest geprüft, ob eine Genkopie von präpro α zur Ausprägung eines Selbstkillerphänotyps ausreicht.

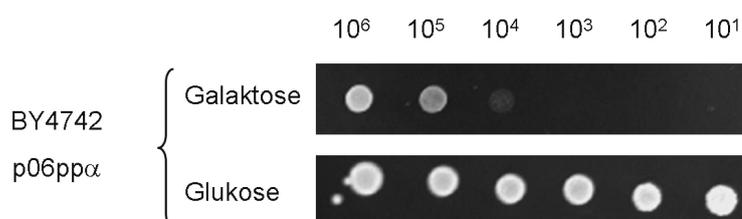


Abbildung 33: Wachstumstest zur Bestimmung der Toxizität des präpro α -Konstrukts nach Integration in das Hefegenom. Das präpro α -Konstrukt lag im integrativen Plasmid pRS306 vor, welches nach Linearisierung durch *StuI* zur Transformation des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 eingesetzt wurde.

Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, zeigten die Zellen unter induktiven Bedingungen lediglich ein Wachstum bis zur Verdünnungsstufe 10^4 , womit bestätigt wurde, dass die Menge von präpro α zur Abtötung der Zellen ausreicht, auch wenn nur eine Genkopie vorhanden war. Weiterhin wurde auch hier überprüft, ob das Konstrukt nach Expression im Western-Blot detektierbar war. Um eine ausreichende Expression von präpro α zu gewährleisten, wurden die Zellen von BY4742 p06pp α ü. N. induziert. Eine Kontrollkultur wurde in nicht-induzierendem Medium belassen. Es wurden jeweils 1×10^8 Zellen geerntet und mittels S80-Schnellaufschluss aufgeschlossen. Die Überstandfraktionen wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot mit primärem anti-K28 α Antikörper durchgeführt (Abbildung 34).

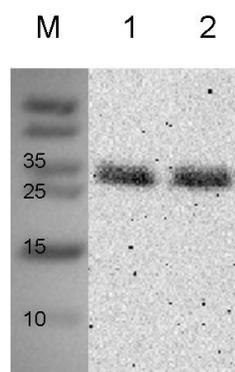


Abbildung 34: Western-Analyse zum Nachweis der intrazellulären Expression von präpro α nach Integration in das Hefegenom. Der Hefestamm BY4742 p06pp α wurde ü. N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert und die Hälfte der Kultur zur Induktion der Expression von pp α in Ura d/o Galaktose-Medium überführt. Nach einer Induktion ü. N. wurden die Zellen mit der S80-Methode aufgeschlossen und die gewonnenen Rohextrakte zur SDS-PAGE und Western-Analyse eingesetzt. Die Entwicklung erfolgte mit dem primären K28 α -Antikörper (1:10.000).

1: BY4742 p06pp α Rohextrakt, Ura d/o Raffinose-Medium (nicht-induziert)

2: BY4742 p06pp α Rohextrakt, Ura d/o Galaktose-Medium (induziert)

Die Western-Analyse zum Nachweis von präpro α zeigte keine Bande auf der erwarteten Höhe bei 10 kDa. Vielmehr ist eine Bande zwischen 30 und 35 kDa zu erkennen, bei der es sich um eine Kreuzreaktion handeln muss, da auch unter nicht-induzierenden Bedingungen das Signal zu erkennen ist. Um auszuschließen, dass die gewählte Aufschlussmethode zum Ausbleiben der präpro α -Bande geführt hat, wurde der Versuch wiederholt und die Rohextrakte mittels Glasperlenaufschluss gewonnen. Auch hier zeigte sich im Western-Blot lediglich eine Bande bei etwa 34 kDa, sowohl unter induzierenden als auch unter nicht-induzierenden Bedingungen (nicht gezeigt). Möglicherweise war bei intrazellulärer Expression die Toxizität des Konstruktpräpro α so hoch, dass die Zellen schon abgetötet wurden, bevor genügend Protein zum Nachweis mittels Western-Analyse gebildet wurde. Selbst wenn die DNA-Sequenz von präpro α in einem „multicopy“-Plasmid vorlag, reichte die exprimierte Menge nicht zum Nachweis im Western-Blot aus. Der Nachweis, dass präpro α

gebildet wurde, konnte anhand von „Pulse“-Experimenten bestätigt werden, in denen radioaktiv markiertes präpro α eindeutige Signale lieferte (Müller, pers. Mitteilung).

Aufgrund der Tatsache, dass zum einen präpro α im Western-Blot nicht nachweisbar war und zum anderen der K28 α -Antikörper eine deutliche Kreuzreaktion zeigte, wurden die Versuche zur Bestimmung der Lokalisation von K28 α mittels IEM an dieser Stelle abgebrochen. Mit den zum Zeitpunkt der Versuche verfügbaren K28-Konstrukten und Antikörpern war eine korrekte Detektion von K28 oder K28 α im Elektronenmikroskop nicht möglich, da endozytotisch aufgenommenes K28 nicht detektiert werden konnte und intrazellulär exprimierte K28 α -Varianten im Falle des Letalkonstrukts präpro α im Western-Blot nicht nachweisbar waren oder als V5-„getaggte“ Variante in einer für eine statistisch sichere Auswertung zu geringen Menge exprimiert wurden.

3.2 Einfluss von K28 α auf den Zellzyklus

Sensitive Zellen der Hefe *S. cerevisiae* zeigen nach Behandlung mit dem Killertoxin K28 einen typischen terminalen Phänotyp, der auf einen Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase hindeutet. Grundlegende Versuche zur Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von K28 auf die Zellzyklusmaschinerie wurden von Reiter (2004) durchgeführt. Dabei wurden u. a. potentielle Interaktionspartner der toxischen K28 α -Untereinheit identifiziert, in MBA-„Screens“ gegen K28 resistente und hypersensitive, Zellzyklus-relevante Deletionsmutanten gefunden und ein Einfluss von K28 auf die Transkription der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p nachgewiesen. Nach dem Modell zur Wirkungsweise von K28, das von Reiter (2004) postuliert wurde, beruht der durch K28 induzierte Zellzyklusarrest auf einer pleiotropen Wirkung von K28 α . Zum einen wechselwirkt K28 α mit dem TATA-Bindeprotein TBP (Spt15p), was zu einer Transkriptionseinhibierung der G1/S-Zyklingene *CLN1* und *CLN2* führt, zum anderen wird der Anaphase-Promoting-Komplex APC durch Wechselwirkung von K28 α mit der APC-Untereinheit Apc2p in seiner Funktion beeinträchtigt (Reiter 2004). In der vorliegenden Arbeit sollten nun die Ergebnisse von Reiter verifiziert werden und weitere Erkenntnisse zum molekularen Wirkmechanismus von K28 α gewonnen werden, um das Verständnis des K28-induzierten Zellzyklusarrests und des daraus resultierenden terminalen Phänotyps zu erweitern.

3.2.1 Studien zur Interaktion zwischen K28 α und den Hefeproteinen Apc2p und Spt15p

Ein Hauptziel bei der Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von K28 α ist es, diejenigen Proteine zu identifizieren, die das „Target“ von K28 α darstellen und die von diesem möglicherweise in ihrer Funktion gehemmt werden, was letztendlich zum Zellzyklusarrest führt. In Yeast-Two-Hybrid-Analysen (Y2H) fand Reiter sechs potentielle Interaktionspartner, von denen Spt15p (TBP) und Apc2p in biochemischen *in vitro* Analysen als Interaktionspartner einer in *E. coli* exprimierten K28 α -Variante weitestgehend bestätigt werden konnten (Reiter 2004). Zur Verifizierung dieser Interaktionen in lebenden Hefezellen kam die bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalyse (BiFC) zur Anwendung, die es ermöglicht, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* zu detektieren. Dabei werden potentielle Bindungspartner jeweils an ein nicht-fluoreszierendes Fragment eines Fluoreszenzproteins fusioniert. Findet eine Interaktion der beiden Proteine statt, so kommt es zur Rekonstitution des Fluoreszenzproteins, welche mikroskopisch detektiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit kam ein von Fan *et al.* (2008) beschriebenes Split-mCherry-System zur Anwendung, welches bereits erfolgreich für *in vivo* Interaktionsstudien mit K28 genutzt wurde (Schäuble 2008). Das rot fluoreszierende Protein mCherry wurde dabei in die Fragmente MN (AS 1-159) und MC (AS 160-234) geteilt und über eine zehn Aminosäuren lange, hydrophobe Linkersequenz (GGGGSGGGGS) mit dem Fänger- und jeweiligen Beuteprotein fusioniert. Der Linker erlaubt zum einen eine erleichterte Faltung der fusionierten Proteine und führt zum anderen zu einer größeren Flexibilität, was die Interaktion von Fänger- und Beuteprotein und die Rekonstitution von mCherry erleichtert (Kerppola 2006).

Als Fängerprotein diente in diesem Versuch K28 α , welches mit dem mCherry-Fragment MN fusioniert wurde. Der Aufbau des Konstrukts ist in Abbildung 35 zu sehen. Um sicherzustellen, dass eine korrekte posttranslationale Modifikation von K28 α im ER abläuft, befand sich vor der MN-K28 α -Fusion die K28-eigene ER-Signalsequenz prä.

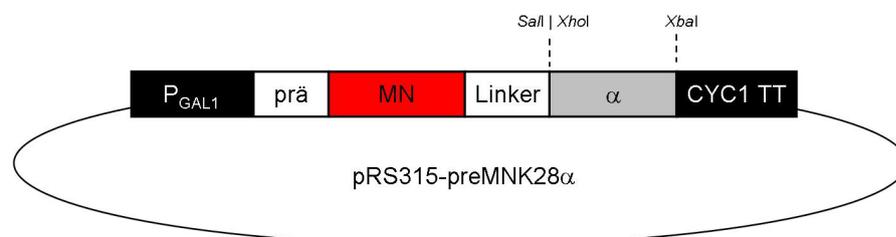


Abbildung 35: Fängerplasmid zum Nachweis einer Interaktion zwischen K28 α und potentiellen Interaktionspartnern im BiFC-System. Die Sequenz von K28 α wurde in das bereits vorhandene Plasmid pRS315-präMnLi (Schäuble 2008) kloniert und somit mit dem N-terminalen Fragment von mCherry fusioniert. Zum ER-Import ist dem Fusionskonstrukt die K28-eigene ER-Signalsequenz vorgeschaltet.

Die Sequenz von K28 α wurde aus dem Vektor pSTBlue-1-K28 α R mittels *XhoI/XbaI*-Verdau ausgeschnitten und in den bereits vorhandenen BiFC-Vektor (Schäuble 2008) pRS315-präMNnLi nach *Sall/XbaI*-Verdau kloniert. Das so entstandene Fängerplasmid pRS315-präMNK28 α wurde zunächst in den *S. cerevisiae* Stamm SEY6210 transformiert und mittels seriellem Verdünnungstest die Toxizität des Fängerkonstrukts MN-K28 α überprüft (Abbildung 36).

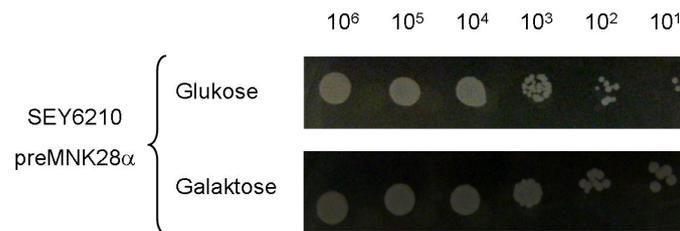


Abbildung 36: Wachstumstest zur Bestimmung der Toxizität des im BiFC-System verwendeten Fängerkonstrukts. Das Fängerkonstrukt setzt sich aus der K28-prä-Sequenz, dem N-terminalen mCherry-Fragment MN und K28 α zusammen. Das Fängerplasmid pRS315-präMNK28 α wurde in den *S. cerevisiae* Stamm SEY6210 transformiert und dieser in einer Verdünnungsreihe auf Galaktose- und Glukose-haltige Agarplatten aufgetropft.

Der Stamm SEY6210 pRS315-präMNK28 α zeigte auch unter induktiven Bedingungen auf Galaktose-haltigen Agarplatten bis zur höchsten Verdünnungsstufe Wachstum, womit ein toxischer Effekt des Fängerproteins MN-K28 α ausgeschlossen werden konnte. Trotz der nicht nachweisbaren Toxizität des Fängerproteins wurde dieses zur BiFC-Analyse eingesetzt.

Die Beuteproteine Apc2p und Spt15p wurden jeweils an das mCherry-Fragment MC durch Ligation in die BiFC-Vektoren pRS316-MCnLi bzw. pRS316-LiMCc (Schäuble 2008) fusioniert. Beide Sequenzen wurden aus genomischer DNA des *S. cerevisiae* Stammes S86c mittels PCR amplifiziert und in den Sequenziervektor pSTBlue-1 zwischenkloniert. Zur Amplifikation von *APC2* wurden die Primer 18 und 19, für *SPT15* die Primer 20 und 21 verwendet. Die *APC2*-Sequenz wurde durch Verdau mit *Sall/XbaI* aus dem pSTBlue-1-Vektor ausgeschnitten und in den ebenfalls *Sall/XbaI* verdauten Vektor pRS316-MCnLi ligiert, sodass im Vektor pRS316-MCAPC2 die *APC2*-Sequenz C-terminal an das MC-Fragment fusioniert vorlag. Das zweite Beuteplasmid pRS316-SPT15MC entstand durch Ligation des *Sall/PauI* geschnittenen Inserts *SPT15* und dem ebenfalls *Sall/PauI* verdauten Beuteplasmid pRS316-LiMCc. In Abbildung 37 ist der schematische Aufbau beider Beuteplasmide gezeigt.

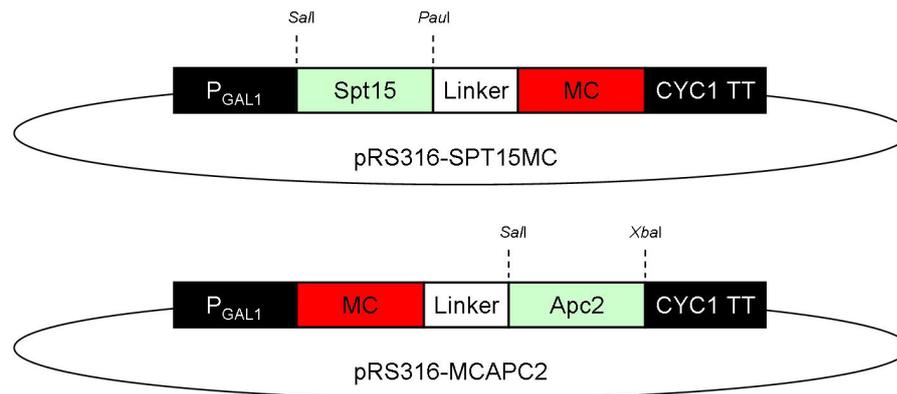


Abbildung 37: Beuteplasmide zum Nachweis einer Interaktion mit K28 α . Beide Beutekonstrukte wurden in die BiFC-Vektoren pRS316-LiMCc und pRS316-MCnLi (Schäuble 2008) kloniert und über eine Linkersequenz mit dem C-terminalen Fragment von mCherry fusioniert.

Beide Beuteplasmide wurden jeweils mit dem Fängerplasmid pRS315-präMNK28 α in den Stamm SEY6210 kotransformiert. Da die Agarplatten auch nach mehreren Tagen keine Koloniebildung zeigten, wurden die Kotransformationen mit dem *S. cerevisiae* Stamm S86c wiederholt. Beide Kotransformationen waren mit diesem Stamm erfolgreich.

Zur Bestimmung der *in vivo* Interaktion zwischen K28 α und Apc2p bzw. Spt15p wurden die kotransformierten Zellen ü. N. bei 20 °C induziert. Tsien (1998) konnte zeigen, dass die Faltung von Fluoreszenzproteinen bei einer niedrigeren Temperatur begünstigt ist. Die Rekonstitution von mCherry und somit der Nachweis einer *in vivo* Interaktion zwischen K28 α und Apc2p bzw. Spt15p wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft (Abbildung 38). Zur Verifizierung des Nachweissystems wurden als Negativkontrolle die BiFC-Vektoren pRS315-MN und pRS316-MC, die die mCherry-Fragmente MN und MC enthalten, in den Stamm S86c kotransformiert und die Zellen ü. N. unter induktiven Bedingungen bei 20 °C kultiviert. Als Positivkontrolle diente das Hsp40 Co-Chaperon Sis1p, welches Homodimere bildet (Sha *et al.* 2000) und schon erfolgreich im BiFC-System eingesetzt wurde (Sung & Huh 2007, Schäuble 2008). Auch hier wurde der Stamm S86c mit den Vektoren pRS315-LiMNcSis1 und pRS316-LiMCcSis1 und ü. N. bei 20 °C induziert. Sowohl die Zellen der Negativ- als auch der Positivkontrolle wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht, wobei wie erwartet die Negativkontrolle keine Fluoreszenz zeigte, wohingegen die Fusionen zwischen Sis1p und den Fragmenten MN und MC zu deutlichen Fluoreszenzsignalen führte (Abbildung 38).

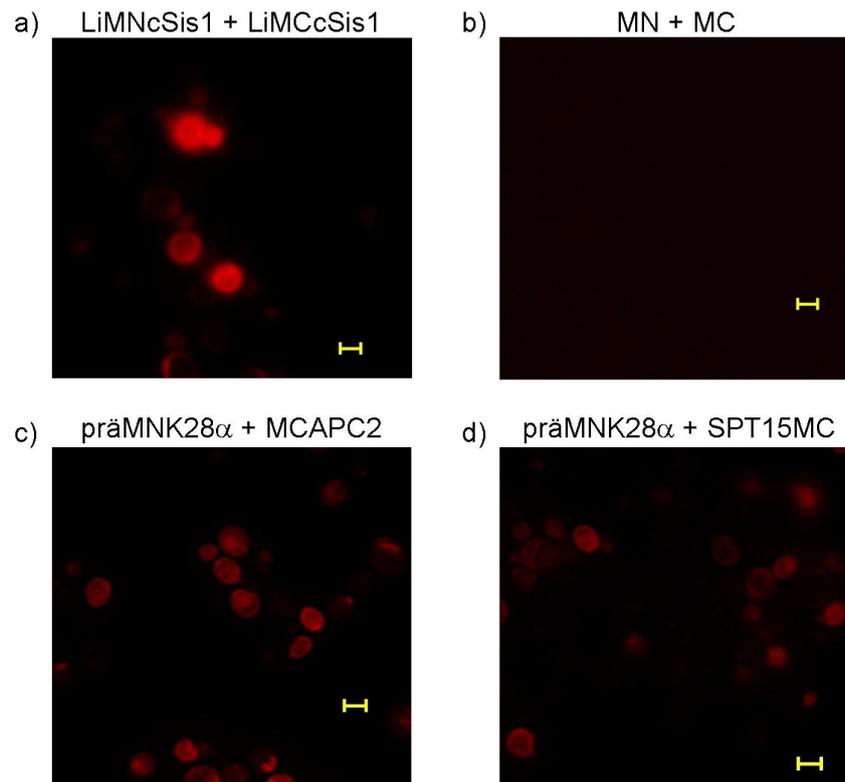


Abbildung 38: Fluoreszenzmikroskopie zur Bestätigung der *in vivo* Interaktion zwischen K28 α und den Hefeproteinen Apc2p und Spt15p mittels BiFC-Analyse. In dem *S. cerevisiae* Stamm S86c wurde das Fängerkonstrukt präMNK28 α mit den Beutekonstrukten MCAPC2 bzw. SPT15MC ü. N. bei 20 °C in Ura d/o Galaktose-Medium koexprimiert. Messbalken: 5 μ m. Mikroskop: Biozero BZ-8000 (KEYENCE), Belichtungszeiten: 1/1,3-1s

Für beide Beuteproteine konnte eine Rekonstitution des Fluorophors mCherry beobachtet werden, womit eine Protein-Protein-Interaktion zwischen K28 α und Apc2p bzw. Spt15p in lebenden Hefezellen bestätigt werden konnte. Die Fluoreszenzsignale deuten dabei in beiden Fällen auf eine zytosolische Lokalisation der interagierenden Proteine hin; Signale in den Nuklei der Zellen waren nicht zu erkennen.

Bei der BiFC-Analyse kann die Orientierung des Beuteproteins zum Fluoreszenzprotein einen erheblichen Einfluss auf dessen Rekonstitution haben und sollte in allen möglichen Varianten getestet werden (Sung & Huh 2007). Neben den gezeigten Konstrukten wurden daher die Beutevarianten APC2MN und MNSPT15 in der Diplomarbeit von Sebastian Thewes (2009) hergestellt und deren Interaktion mit dem Fängerkonstrukt präMCK28 α untersucht. Eine Fluoreszenzrekonstitution von mCherry konnte dabei nicht beobachtet werden (Thewes 2009), sodass davon auszugehen ist, dass die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Beutefusionen schon bereits die optimalste Orientierung zwischen Beuteprotein und mCherry-Fragment aufwiesen. Biochemische Untersuchungen zur Interaktion zwischen Apc2p bzw. Spt15p und einer intrazellulär exprimierten ppV5 α -Variante konnten die im BiFC beobachteten Interaktionen bisher nicht bestätigen (Poppek 2011, Buck 2012).

In der Diplomarbeit von Sebastian Thewes (2009) wurde das beschriebene System genutzt, um weitere *in vivo* Interaktionspartner von K28 α zu identifizieren. Der Fokus lag dabei auf weiteren potentiellen K28 α -Interaktionspartnern, die von Reiter (2004) mittels Y2H-System oder TAP-„Tag“-Analyse gefunden wurden, bisher allerdings ein biochemischer Nachweis der Interaktionen nicht erfolgreich war oder noch nicht durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden weitere Zellzyklus-regulatorische Proteine getestet, die als „Target“ von K28 α in Betracht gezogen werden konnten und deren Deletion zu einem gegenüber K28 vermindert sensitiven oder hypersensitiven Phänotyp führte (Reiter 2004). Tabelle 11 gibt einen Überblick über die von Thewes (2009) getesteten Beuteproteine und ob eine Fluoreszenzrekonstitution und somit Interaktion mit K28 α zu beobachten war.

Tabelle 11: Proteine, die als Beuteproteine im BiFC-Assay auf eine mögliche Interaktion mit K28 α getestet wurden. Die Daten entstammen der Diplomarbeit von Thewes 2009

Beuteprotein	Interaktion mit K28 α	Beuteprotein	Interaktion mit K28 α
<i>BUR2</i>	+	<i>PHO85</i>	-
<i>SSN8</i>	-	<i>CSE2</i>	-
<i>SWI6</i>	-	<i>ELM1</i>	-
<i>CLN2</i>	-	<i>CLN3</i>	-
<i>TAF1</i>	-	<i>POL30</i>	-
<i>CDC28</i>	-	<i>CDC4</i>	-
<i>SIC1</i>	+	<i>CDC34</i>	-
<i>SHP1</i>	-	<i>ORC1</i>	-
<i>CLB5</i>	-	<i>CTR9</i>	-
<i>CLB6</i>	-		

Mittels BiFC-Analyse konnte für die Proteine Bur2p und Sic1p eine Fluoreszenzrekonstitution und somit eine mögliche Interaktion mit K28 α nachgewiesen werden. Bei Bur2p handelt es sich um ein Zyklin der Kinase Bur1p, die zusammen als Zyklin-CDK-Komplex an der Regulation der RNA-Polymerase II und somit der Transkription beteiligt sind (Yao *et al.* 2000). Sic1p ist ein CDK-Inhibitor Protein (CKI) und hemmt Proteinkomplexe bestehend aus Cdc28p und den B-Typ Zyklinen Clb5p und Clb6p (Enserink & Kolodner 2010, Mendenhall *et al.* 1995). Aufgrund der schwachen Fluoreszenzsignale ist eine detailliertere Untersuchung nötig, um beispielsweise mittels biochemischer Ko-Immunopräzipitation oder His-„Pulldown“-Experimenten eine Interaktion zwischen K28 α und Bur2p bzw. Sic1p zu bestätigen.

3.2.2 Toxizitätsuntersuchungen zur Identifizierung K28-resistenter bzw. -hypersensitiver Deletionsmutanten der Hefe *S. cerevisiae*

Zur Aufklärung der Wirkungsweise von K28 auf den Zellzyklus von *S. cerevisiae* wurden bereits von Reiter (2004) insgesamt 415 Mutanten mit Deletionen in Zellzyklus-regulierten Genen im MBA gegen K28 getestet. Dabei wurden mehrere resistente oder hypersensitive Mutanten gefunden, bei denen Gene deletiert waren, die an vielen zellulären Prozessen wie z.B. Transkription, Zellzyklusregulation oder DNA-Reparatur beteiligt sind. Ein genaueres Modell zur Wirkungsweise von K28 konnte auf diese Weise allerdings noch nicht hergeleitet werden. In der vorliegenden Arbeit sollte durch die Untersuchung weiterer Mutanten das bereits vorhandene Wissen erweitert werden, um Rückschlüsse auf die Wirkungsweise des Toxins ziehen zu können. Im Fokus lagen dabei u. a. Deletionsmutanten, die eine Resistenz gegen die beiden anderen bekannten Zellzyklus-arretierenden Killertoxine Zymocin und PaT zeigen, sowie Mutanten die an der Regulation der Transkription und an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Die Deletionsmutanten entstammten einer *S. cerevisiae* „Knock-out“-Kollektion (OPEN BIOSYSTEMS) und wurden im Agardiffusionstest gegen 100x konzentrierten K28-haltigen Hefezellüberstand getestet. Die Hemmhofdurchmesser der Mutanten wurden mit dem des Wildtypstammes BY4742 (17 mm) verglichen. Dabei muss beachtet werden, dass der Konzentrations-Gradient des Toxinkonzentrates vom Stanzloch bis zum Rand der Agarplatte aufgrund der Diffusion logarithmisch abnimmt, weswegen schon ein geringer Unterschied im Hemmhofdurchmesser eine deutlich gesteigerte oder verminderte K28-Sensitivität widerspiegelt. Ein nur um 30 % vergrößerter Hemmhofdurchmesser entspricht je nach verwendetem Toxinkonzentrat einer dreifach stärkeren Sensitivität der Mutante im Vergleich zum Wildtypstamm (Reiter 2004). Aufgrund dessen und aufgrund der Ungenauigkeit des Testsystems wurden nur Mutanten mit einem im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm um 30 % vergrößerten Hemmhofdurchmesser (≥ 22 mm) als hypersensitiv und solche mit einem um 30 % verkleinerten Hemmhofdurchmesser (≤ 12 mm) als signifikant vermindert sensitiv angesehen. Bei der Darstellung der Ergebnisse in den Tabellen Tabelle 12 bis Tabelle 24 sind die Mutanten jeweils bezüglich der relevanten Proteinkomplexe bzw. der zellulären Prozessen, an denen sie beteiligt sind, zusammengefasst.

3.2.2.1 tRNA-Modifikation

Mit dem Killertoxin Zymocin der Milchhefe *K. lactis* wurde im Jahr 2005 zum ersten Mal die Wirkungsweise eines Zellzyklus-arretierenden Killertoxins aufgeklärt. Es zeigte sich dabei, dass das Toxin als tRNA-Endonuklease bestimmte tRNA-Spezies im Anticodonbereich schneidet, was auf noch unbekanntem Weg zum Zellzyklusarrest führt (Lu *et al.* 2005). Auch bei der Aufklärung des Wirkmechanismus von Zymocin spielte die Analyse von

Deletionsmutanten eine entscheidende Rolle. Bereits vor der Aufklärung der Zymocinwirkung war bekannt, dass die Deletion einer der sechs Untereinheiten des Elongator-Komplexes (Elp1p-Elp6p) zu einer Resistenz der Mutanten gegen Zymocin führt. Da dieser Komplex an der Elongation der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription beteiligt ist (Otero *et al.* 1999), wurde zunächst ein Model vorgeschlagen, in dem Zymocin den Elongator-Komplex inhibiert und durch Ausschalten der Transkription G1-spezifischer Gene den Arrest des Zellzyklus induziert (Frohloff *et al.* 2001, Jablonowski *et al.* 2001, Jablonowski & Schaffrath 2002). Erst als bekannt war, dass der Elongator-Komplex auch an weiteren zellulären Mechanismen wie Exozytose (Rahl *et al.* 2005) und tRNA-Modifikation beteiligt ist (Huang *et al.* 2005), richtete sich der Blickwinkel von der Transkription zum tRNA-Metabolismus. Aufgrund der Resistenz von Elongator-Deletionsmutanten gegenüber Zymocin wurden diese ebenfalls im MBA-Test gegen K28-Toxinkonzentrat getestet (Tabelle 12). Es wurden alle Elongator-Untereinheiten getestet, mit Ausnahme von $\Delta elp5$, welche in der verfügbaren Deletionsbank nicht vorhanden war.

Tabelle 12: Sensitivität von Deletionsmutanten des Elongator-Komplexes gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
ELP1	YLR384C	23
ELP2	YGR200C	18
ELP3	YPL086C	18
ELP4	YPL101W	20
ELP6	YMR312W	22

Es zeigte sich, dass das Fehlen einer Untereinheit des Elongator-Komplexes im Gegensatz zu Zymocin keine Resistenz gegenüber K28 hervorruft. Vielmehr zeigte die Deletion von *ELP1* und *ELP6* sogar einen hypersensitiven Phänotyp.

Neben dem Elongator-Komplex ist eine Vielzahl weiterer Proteine an der Modifikation von tRNAs beteiligt, u.a. Proteine der *TRM*-Familie, die als tRNA-Methyltransferasen ein tRNA-Molekül an einer jeweils spezifischen Stelle methylieren können. Von besonderem Interesse im Hinblick auf Toxinresistenz ist dabei die tRNA-Methyltransferase Trm9p, da die Deletion dieses Proteins eine Resistenz gegen Zymocin und auch gegen das *Pichia acaciae* Toxin PaT hervorruft (Klassen *et al.* 2008, Studte 2008). Sowohl Trm9p als auch die Elongator-Untereinheit Elp3p sind an der Modifikation von Uridin zu 5-Methoxycarbonylmethyluridin (mcm⁵U) beteiligt (Abbildung 39). Nur bei Vorhandensein dieser Modifikation können die Killertoxine Zymocin und PaT die entsprechenden tRNA-Moleküle schneiden.

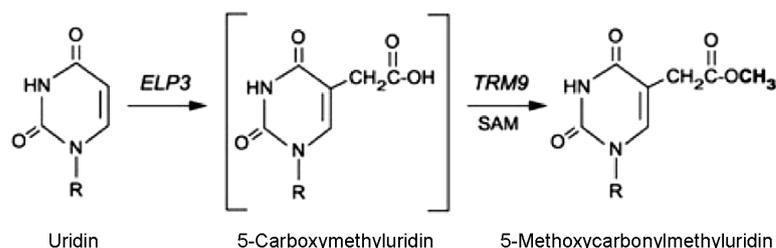


Abbildung 39: Schema der Uridin-Modifikation bei tRNAs durch Elp3p und Trm9p. SAM: S-Adenosylmethionin (verändert nach Klassen *et al.* 2008)

Zum Vergleich der Wirkungsweise von K28 mit den tRNAsen Zymocin und PaT wurden daher alle verfügbaren Mutanten mit Deletionen in Genen der *TRM*-Familie auf ihre Sensitivität gegenüber K28 getestet (Tabelle 13). Ausnahmen waren hierbei die essentiellen Gene der tRNA-Methyltransferasen *TRM5*, *TRM6* und *TRM112*; sowie *TRM7* und *TRM140*, die in der verfügbaren Deletionsbank nicht vorhanden war.

Tabelle 13: Sensitivität von Deletionsmutanten der *TRM*-Methyltransferasefamilie gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
<i>TRM1</i>	YDR120C	21
<i>TRM2</i>	YKR056W	20
<i>TRM3</i>	YDL112W	19
<i>TRM4</i>	YBL024W	20
<i>TRM8</i>	YDL201W	18
<i>TRM9</i>	YML014W	25
<i>TRM10</i>	YOL093W	19
<i>TRM11</i>	YOL124C	20
<i>TRM12</i>	YML005W	19
<i>TRM13</i>	YOL125W	18
<i>TRM44</i>	YPL030W	19
<i>TRM82</i>	YDR165W	19

Die Deletion einer tRNA-Methyltransferase der *TRM*-Familie führte zu keiner Resistenz gegenüber dem Killertoxin K28. Die Deletion von *TRM9*, welche zu einer Resistenz gegen Zymocin und PaT führt, verursachte eine deutliche Hypersensitivität gegenüber K28. In Bezug auf die Modifikation von Uridin zu 5-Methoxycarbonylmethyluridin zeigt Tabelle 14 einen Überblick, welche Deletion eine Resistenz gegenüber Zymocin, PaT und K28 verursacht.

Tabelle 14: Vergleich der Wirkung der Killertoxine Zymocin, PaT und K28 bei Deletion der Gene *ELP3* oder *TRM9*.

Gendeletion	Zymocin	PaT	K28
<i>ELP3</i>	resistent	sensitiv	sensitiv
<i>TRM9</i>	resistent	resistent	hypersensitiv

Die Angaben in Tabelle 14 machen deutlich, dass die Zellzyklus-arretierende Wirkung von K28 auf einem anderen molekularen Wirkmechanismus basieren muss, als die der Toxine Zymocin und PaT. Der Verlust eines tRNA-modifizierenden Enzyms, welche zu einer Resistenz gegenüber Zymocin oder PaT führt, ruft keine schützende Wirkung vor K28 hervor. Vielmehr zeigten die Mutanten *Δelp1*, *Δelp6* und *Δtrm9* eine K28-Hypersensitivität.

3.2.2.2 DNA-Reparatur

Schon seit längerem ist bekannt, dass die Killertoxine PaT und Zymocin in den Zielzellen neben der endonukleolytischen Spaltung von tRNAs auch DNA-Schäden verursachen, was in einer Aktivierung des „DNA-Damage-Checkpoints“ resultiert (Klassen & Meinhardt 2005, Klassen *et al.* 2004, 2011). Zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen stehen dabei der Zelle zwei alternative Mechanismen zur Verfügung. Die Reparatur erfolgt mittels homologer Rekombination durch Proteine der *RAD52* Epistasisgruppe oder mittels „non-homologous end joining“ (NHEJ) durch die Ku-Proteine Yku70p und Yku80p. Interessanterweise reagieren Mutanten mit Defekten in Genen der *RAD52* Epistasisgruppe hypersensitiv und Mutanten, bei denen *YKU70* oder *YKU80* deletiert sind, teilweise resistent gegenüber PaT (Klassen *et al.* 2007). Ein Effekt von K28 auf die DNA-Integrität ist bisher nicht beschrieben. Daher wurde die K28-Sensitivität aller verfügbaren Mutanten mit Deletionen in Genen der *RAD52* Epistasisgruppe und des NHEJ im MBA getestet (Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 15: Sensitivität von Deletionsmutanten der *RAD52* Epistasisgruppe gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm).

Gendeletion	ORF	Ø
<i>RAD54</i>	YGL163C	19
<i>RAD50</i>	YNL250W	18
<i>RAD59</i>	YDL059C	18
<i>MRE11</i>	YMR224C	18
<i>RAD51</i>	YER095W	16
<i>RAD55</i>	YDR076W	16
<i>RAD57</i>	YDR004W	16
<i>RAD52</i>	YML032C	14

Tabelle 16: Sensitivität von Deletionsmutanten des „non-homologous end joining“ (NHEJ) gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Vermindert sensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
<i>MUS81</i>	YDR386W	17
<i>LIF1</i>	YGL090W	16
<i>YKU80</i>	YMR106C	15
<i>YKU70</i>	YMR284W	14
<i>SGS1</i>	YMR190C	12

Die Tabellen 15 und 16 verdeutlichen, dass die Deletion eines Gens der DNA-Reparatur kaum eine Auswirkung auf die Sensitivität gegenüber K28 hat. Mutanten der *RAD52* Epistasisgruppe zeigten im Gegensatz zu PaT keine Hypersensitivität gegen K28. Eine K28-Resistenz bei der Deletion von *YKU70* oder *YKU80* konnte nicht beobachtet werden, wengleich *SGS1*, ein weiteres Protein des NHEJ, eine verminderte Sensitivität aufwies.

3.2.2.3 Transkription

Die Ergebnisse von Reiter (2004) deuten auf eine K28-induzierte Hemmung der G1/S-Zyclintranskription hin. Zum einen wurden mit Ctr9p und Spt15p potentielle Interaktionspartner der toxischen K28 α -Untereinheit identifiziert. Bei Spt15p handelt es sich um das TATA-Box Bindeprotein, das essentieller Bestandteil der Transkriptionsmaschinerie ist. Ctr9p wurde als wichtiger Regulator bei der Transkription der G1/S-Zykline beschrieben (Koch *et al.* 1999). Zum anderen konnte Reiter zeigen, dass in K28-behandelten Hefesphäroplasten die mRNA-Level der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p im zeitlichen Verlauf abnehmen. Um die Wirkung von K28 auf die Transkriptionsmaschinerie näher zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit alle verfügbaren Mutanten getestet, die eine Deletion in einem nicht essentiellen Regulator der RNA-Polymerase II aufweisen. Bei den getesteten Regulatoren handelt es sich meist um Multiproteinkomplexe, von denen jeweils nur einzelne Untereinheiten deletiert sind. Getestet wurden neben RNAPII-Mutanten die Komplexe SAGA, Srb/Med (Mediator), SWI/SNF, RSC, THO/TREX und Paf1C. Bei Untereinheiten der generellen Transkriptionsfaktoren TFIID, TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF und TFIIH handelt es sich fast ausschließlich um essentielle Proteine, weswegen diese nicht getestet werden konnten.

Die Initiation der Transkription setzt die Bildung des Präinitiationskomplexes voraus. Zunächst bindet der Transkriptionsfaktor TFIID durch seine TBP-Untereinheit mit Hilfe der Gen-spezifischen TAFs an die TATA-Box eines Promotors, worauf die Rekrutierung der weiteren generellen Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIH und der RNAPII erfolgt. An die Promotoren von Genen, deren Transkription durch ein Aktivatorprotein

reguliert wird, binden zusätzliche Koaktivatoren, die durch ihre Histon-Acetyltransferaseaktivität die Chromatinstruktur auflockern und somit die DNA für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich machen. Zu den am besten untersuchten Chromatin-„Remodelling“-Komplexen zählen der SAGA-, Srb/Med- und SWI/SNF-Komplex.

Bei dem SAGA-Komplex (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) handelt es sich um einen 1,8 MDa großen, multifunktionalen Proteinkomplex, der aus etwa 14 Untereinheiten besteht und als Koaktivator die Transkription einer Vielzahl von Genen reguliert (Wu *et al.* 2004). Da dieser Komplex auch an der Rekrutierung des TBP an die Promotor-DNA beteiligt ist (Larschan & Winston 2001) und einige TAFs auch als SAGA-Untereinheiten dienen (Wu *et al.* 2004), ist vorstellbar, dass die K28-induzierte Hemmung der G1/S-Zylintranskription u. a. durch einen negativen Effekt von K28 auf den SAGA-Komplex hervorgerufen wird. Alle verfügbaren Mutanten, die eine Deletion einer nicht-essentiellen Untereinheit des SAGA-Komplexes aufwiesen, wurden daher im MBA-Test untersucht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Sensitivität von Deletionsmutanten des SAGA-Komplexes gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
GCN5	YGR252W	23
SPT7	YBR081C	23
ADA2	YDR448W	22
SGF29	YCL010C	22
HFI1	YPL254W	22
SPT20	YOL148C	22
CHD1	YER164W	21
SGF11	YPL047W	20
SPT3	YDR392W	20
NGG1	YDR176W	18
SGF73	YGL066W	18
SPT8	YLR055C	18
UBP8	YMR223W	16

Es zeigte sich hierbei, dass die Deletion einer Untereinheit des SAGA-Komplexes in sechs von 13 Mutanten zu einer deutlichen Hypersensitivität von *S. cerevisiae* gegenüber K28 führt. Keine der Deletionsmutanten zeigte eine signifikant verminderte Sensitivität.

Der Mediator-Komplex stellt einen Multiproteinkomplex dar, der als eine Art „Brücke“ fungiert und Verbindungen zwischen Aktivatorproteinen und der basalen Transkriptionsmaschinerie vermittelt. Er interagiert direkt mit der RNAPII und wird für die Transkriptionsaktivierung

nahezu aller Protein-kodierenden Gene benötigt (Björklund & Gustafsson 2005). Der Komplex besteht aus 24 Untereinheiten (Reeves & Hahn 2003), von denen alle 15 nicht-essentiellen Untereinheiten im MBA-Test untersucht wurden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Sensitivität von Deletionsmutanten des Mediator-Komplexes gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive bzw. resistente Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
GAL11	YOL051W	24
ROX3	YBL093C	23
SOH1	YGL127C	23
SRB2	YHR041C	23
MED2	YDL005C	22
<i>PGD1</i>	<i>YGL025C</i>	21
<i>SRB5</i>	<i>YGR104C</i>	20
<i>MED1</i>	<i>YPR070W</i>	18
<i>TAF14</i>	<i>YPL129W</i>	17
<i>SRB8</i>	<i>YCR081W</i>	15
<i>NUT1</i>	<i>YGL151W</i>	14
CSE2	YNR010W	0
SSN8	YNL025C	0
SSN2	YDR443C	0
SIN4	YNL236W	0

Tabelle 18 veranschaulicht, dass mehrere Untereinheiten des Mediator-Komplexes bei Deletion die Sensitivität der Zellen gegenüber K28 deutlich verändern. Fünf der 15 getesteten Mutanten zeigten eine K28-Hypersensitivität, die Deletion von *SSN2* und *SIN4* führte zu einer vollständigen Resistenz der Zellen gegen das Toxin. Die Deletion von *CSE2* und *SSN8* wurden bereits von Reiter (2004) getestet und zeigten ebenfalls eine vollständige Resistenz.

Der SWI/SNF-Komplex ist ein aus 11 Untereinheiten bestehender Multiproteinkomplex, der ebenfalls als „Chromatin-Remodelin“-Komplex an der Regulation der Transkription beteiligt ist (Smith *et al.* 2003). Alle Deletionsmutanten der acht nicht-essentiellen Untereinheiten wurden im MBA-Test untersucht (Tabelle 19).

Tabelle 19: Sensitivität von Deletionsmutanten des SWI/SNF-Komplexes gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
SNF5	YBR289W	23
<i>RTT102</i>	YGR275W	19
<i>SNF2</i>	YOR290C	18
<i>SNF11</i>	YDR073W	18
<i>SNF6</i>	YHL025W	17
<i>SWI3</i>	YJL176C	17
<i>SWP82</i>	YFL049W	17
<i>SNF12</i>	YNR023W	15

Die Deletion einer Unterheit des SWI/SNF-Komplexes führte zu keiner verminderten Sensitivität. Die Hemmhofdurchmesser entsprachen weitestgehend dem des Wildtypstammes BY4742. Die einzige Ausnahme stellte die Mutante *SNF5* dar, die hypersensitiv auf K28 reagierte.

Ein dem SWI/SNF ähnlicher Komplex ist der RSC-Komplex („Remodel the Structure of Chromatin“), der ebenfalls in der Lage ist, ATP-abhängig die Chromatinstruktur zu verändern (Wilson *et al.* 2006). Beide Komplexe teilen sich mehrere Untereinheiten bzw. bestehen aus homologen Proteinen und sind als Koaktivatoren an der Regulation der RNAPII beteiligt. Dem RSC-Komplex, der etwa zehnmals häufiger in der Zelle vorkommt als der SWI/SNF-Komplex, konnte bereits eine essentielle Funktion bei der Zellzyklusprogression zugeschrieben werden (Cairns *et al.* 1996, Cao *et al.* 1997, Du *et al.* 1998). Von den 15 Untereinheiten wurden fünf Mutanten im MBA getestet (Tabelle 20). Bei acht Untereinheiten handelt es sich um essentielle Proteine, zwei Mutanten (*RSC3*, *RSC30*) waren in der verfügbaren Deletionsbank nicht vorhanden.

Tabelle 20: Sensitivität von Deletionsmutanten des RSC-Komplexes gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
NPL6	YMR091C	26
HTL1	YCR020W-B	22
<i>RSC2</i>	YLR357W	21
<i>RSC1</i>	YGR056W	20
<i>RTT102</i>	YGR275W	19

Die Ergebnisse aus Tabelle 20 verdeutlichen, dass auch bei der Deletion einer Untereinheit im RSC-Komplex keine Resistenz gegen K28 auftritt. Auch hier zeigten die Mutanten eine Tendenz zu einer erhöhten Sensitivität. Eindeutig hypersensitiv verhielt sich die Mutante *NPL6* mit einem Hemmhofdurchmesser von 26 mm.

Bei den bisher aufgeführten Regulatoren der RNAPII handelt es sich um Koaktivatoren, die bei der Initiation der Transkription eine Rolle spielen. Daneben findet die Regulation der Transkription auf Ebene der Elongation noch durch weitere Regulatorkomplexe statt. Im Hinblick auf den Wirkmechanismus von K28 stellt dabei der Paf1-Komplex einen besonders interessanten Regulator dar, da dieser an der Transkription der G1/S-Zyklone beteiligt ist (Koch *et al.* 1999) und die Untereinheit Ctr9p von Reiter (2004) als potentieller Interaktionspartner identifiziert wurde. Zum Zeitpunkt der Arbeiten von Reiter stand keine *CTR9* Deletionsmutante zur Verfügung, weswegen diese besonders im Fokus der Analyse lag. Bei den weiteren vier Untereinheiten des Paf1-Komplexes handelt es sich ebenfalls um nicht-essentielle Proteine, sodass sämtliche Deletionsmutanten des Komplexes getestet werden konnten (Tabelle 21).

Tabelle 21: Sensitivität von Deletionsmutanten des Paf1-Komplexes gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
<i>PAF1</i>	<i>YBR279W</i>	28
<i>CTR9</i>	<i>YOL145C</i>	25
<i>CDC73</i>	<i>YLR418C</i>	20
<i>LEO1</i>	<i>YOR123C</i>	19
<i>RTF1</i>	<i>YGL244W</i>	16

Die Deletion einer Untereinheit des Paf1-Komplexes führte tendenziell zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber K28. Mutationen in *CTR9* und *PAF1* zeigten dabei deutliche Hypersensitivitäten mit Hemmhofdurchmessern von 25 bzw. 28 mm. Von allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten Deletionsmutanten wies die *PAF1* Mutante (neben der *CTK1* Mutante, s. u.) die höchste Hypersensitivität auf. Interessanterweise wird sowohl Paf1p als auch Ctr9p eine Funktion bei der Transkription der G1/S-Zyklone *Cln1p* und *Cln2p* zugeschrieben. Bei Verlust einer der beiden Untereinheiten ist u.a. die *CLN2*-Transkription erheblich beeinträchtigt (Koch *et al.* 1999).

Ein weiterer Elongationsfaktor, der im Rahmen der Deletionsbank-Analyse überprüft wurde, ist der THO/TREX-Komplex. Dieser ist zum einen an der Transkriptionselongation beteiligt, zum anderen stellt er eine Verbindung zwischen Transkription und mRNA-Export her (Sträßler *et al.* 2002, Rondón *et al.* 2003). Untersucht wurden drei der vier Untereinheiten des THO-Komplexes sowie das einzige nicht-essentielle Protein des TREX-Komplex, *TEX1* (Tabelle 22).

Tabelle 22: Sensitivität von Deletionsmutanten des THO/TREX-Komplexes gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
<i>THO2</i>	YNL139C	23
<i>MFT1</i>	YML062C	16
<i>THP2</i>	YHR167W	16
<i>TEX1</i>	YNL253W	16

Mutanten mit Deletionen im THO/TREX-Komplex verhielten sich im MBA-Test nahezu identisch zum Wildtypstamm BY4742. Lediglich die Deletion von *THO2* führte zu einer Hypersensitivität der Zellen gegenüber K28.

Neben den aufgeführten Mutanten, die Deletionen in Regulatoren der RNAPII aufweisen, wurden auch Mutanten der RNAPII getestet. Dieser Multiproteinkomplex setzt sich aus 12 Untereinheiten zusammen, von denen lediglich zwei nicht essentiell sind, die beide im MBA-Test untersucht wurden (Tabelle 23).

Beide nicht-essentielle Untereinheiten der RNAPII führten bei Deletion zu einer vollständigen Resistenz gegenüber K28. Zur Überprüfung, ob die Resistenz tatsächlich auf der jeweiligen Deletion beruht, wurden die Untereinheiten Rpb4p und Rpb9p in ihrer entsprechenden Deletionsmutante überexprimiert und die damit möglicherweise wiederhergestellte K28-Sensitivität im MBA-Test untersucht.

Dazu wurden die Sequenzen *RPB4* und *RPB9* aus genomischer DNA des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 mit den Primer 22 und 23 bzw. 24 und 25 mittels PCR amplifiziert. Beide Amplifikate wurden in den Hefeexpressionsvektor pYES2.1 ligiert und nach korrekter Sequenzierung in die beiden Mutanten transformiert. Beide transformierten Mutanten wurden im MBA-Test unter induzierenden Bedingungen überprüft. Zum Vergleich mit dem Wildtypstamm BY4742 wurde dessen Sensitivität in SC Galaktose-MBA getestet (Tabelle 23).

Tabelle 23: Sensitivität von Deletionsmutanten der RNAPII gegen K28 sowie nach Überexpression der deletierten Proteine. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben. Resistente Mutanten sind fettgedruckt.

Relevanter Genotyp	Plasmid	Ø
BY4742wt	-	17
$\Delta rpb4$	-	0
$\Delta rpb4$	pYES2.1-RPB4	16
$\Delta rpb9$	-	0
$\Delta rpb9$	pYES2.1-RPB9	17

Die Ergebnisse in Tabelle 23, sowie die grafische Darstellung in Abbildung 40 veranschaulichen, dass durch die Überexpression von Rpb4p in der $\Delta rpb4$ -Mutante bzw. von Rpb9p in der $\Delta rpb9$ -Mutante die Sensitivität der Zellen gegenüber K28 wiederhergestellt wurde. Somit wird bestätigt, dass die Deletion dieser RNAPII-Untereinheiten tatsächlich eine Toxinresistenz bewirkt.

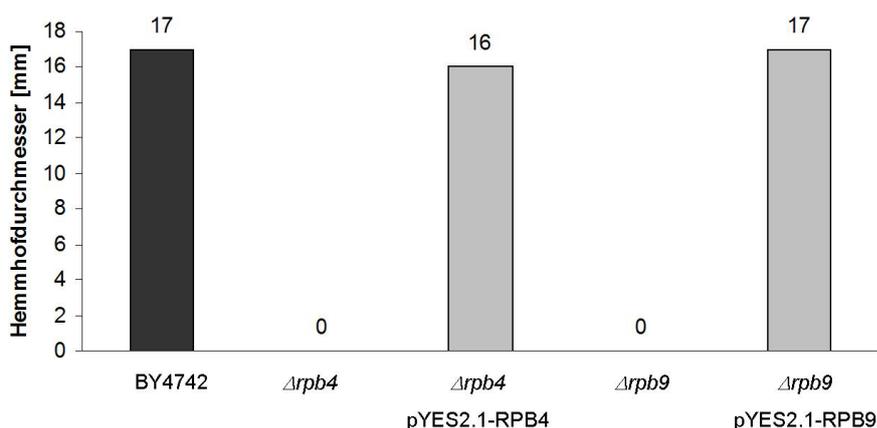


Abbildung 40: K28-Sensitivität der RNAPII-Mutanten *RPB4* und *RPB9* vor und nach Überexpression des jeweils deletierten Gens. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt. Zum Vergleich ist ebenso der Hemmhof des Wildtypstammes BY4742 angegeben.

Eine weitere Ebene der transkriptionellen Regulation umfasst die Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der größten RNA-Polymerase II-Untereinheit Rpb1p. Verantwortlich dafür ist u. a. die „C-terminale Domänen Kinase 1“ (CTDK-1), die sich aus den drei Untereinheiten Ctk1p, Ctk2p und Ctk3p zusammensetzt (Sternier *et al.* 1995). Interessanterweise erfolgt die Regulation der katalytischen Untereinheit Ctk1p durch die Kinase Cak1p, die ebenfalls an der Regulation von Cdc28p beteiligt ist, womit eine Verbindung zur Zellzykluskontrolle besteht (Ostapenko & Solomon 2005). Die K28-Sensitivität der verfügbaren Deletionsmutanten $\Delta ctk1$ und $\Delta ctk3$ wurden daher im MBA-Test untersucht (Tabelle 24). Es zeigte sich eine deutliche Hypersensitivität beider Mutanten.

Tabelle 24: Sensitivität von Deletionsmutanten der CTDK-1 gegenüber K28. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und ist als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 17 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	ORF	Ø
CTK1	YKL139W	28
CTK3	YML112W	25

Abbildung 41 fasst alle hypersensitiven und resistenten Mutanten mit Deletionen in Genen, die an der RNAPII-abhängigen Transkription beteiligt sind, zusammen. Es zeigt sich deutlich, dass ein Großteil der Mutanten einen K28-hypersensitiven Phänotyp aufweist. Bei allen Koaktivatoren der RNAPII (SAGA, Srb/Med, SWI/SNF, RSC, THO/TREX, Paf1C) finden sich hypersensitive Mutanten. Lediglich der Srb/Med-Komplex enthält neben der RNAPII selbst Untereinheiten, die bei Deletion zu einer K28-Resistenz führten. Auffallend ist, dass keine Mutanten mit lediglich verminderter Sensitivität identifiziert wurden. Die Tatsache, dass eine Vielzahl an Deletionsmutanten eine deutlich veränderte K28-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp zeigte, untermauert die Hypothese, dass K28 die RNAPII-abhängige Transkription beeinflusst. Durch gezielte Hemmung der Transkription von Zellzyklusregulatoren ist ein dadurch bedingter Zellzyklusarrest an der G1/S-Transition vorstellbar.

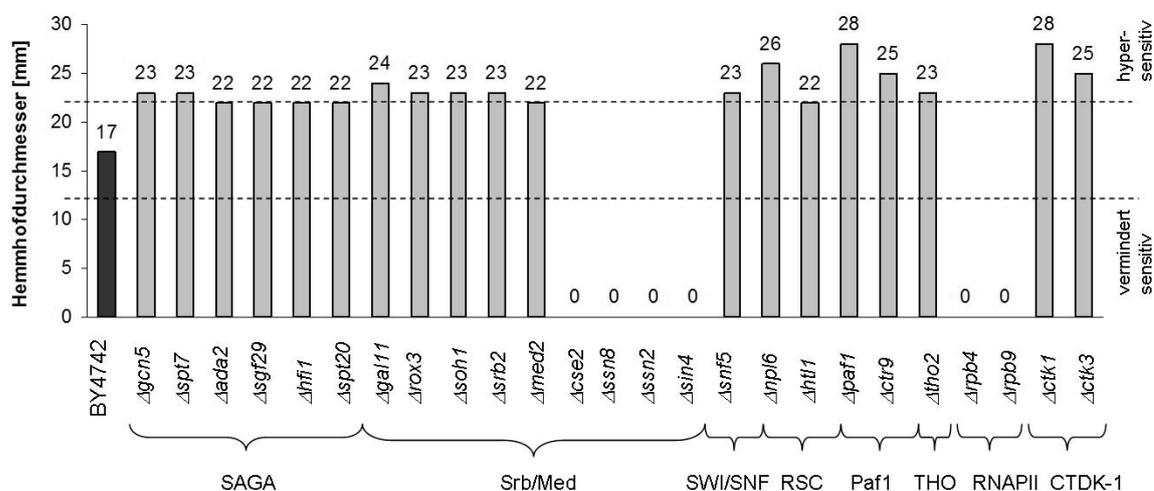


Abbildung 41: K28-hypersensitive und -resistente Mutanten mit Deletionen in Transkriptionsregulatorischen Genen. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben. Mutanten mit einem Hemmhofdurchmesser ≥ 22 mm gelten als hypersensitiv, solche mit ≤ 12 mm als signifikant vermindert sensitiv. Ebenfalls angegeben sind die Komplexe, in denen das jeweils deletierte Protein vorkommt.

Um zu überprüfen, ob die beobachteten hypersensitiven Reaktionen auf eine direkte Beeinflussung durch K28 zurückzuführen sind, oder ob die Mutanten durch die entsprechende Deletion generell in ihrer Viabilität und somit Widerstandsfähigkeit gegenüber toxischen Faktoren eingeschränkt sind, wurden alle Deletionsmutanten, die einen

hypersensitiven Phänotyp gegenüber K28 zeigten, auch auf ihre Sensitivität gegenüber dem ionophoren Killertoxin K1 im MBA getestet (Tabelle 25, Abbildung 42). Zur Vollständigkeit wurden ebenso die Deletionsmutanten getestet, die eine K28-Resistenz aufwiesen.

Tabelle 25: Sensitivität K28-hypersensitiver und -resistenter Deletionsmutanten gegenüber dem ionophor wirkenden Killertoxin K1. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben (BY4742wt: 24 mm). Hypersensitive Mutanten sind fettgedruckt.

Gendeletion	Ø
<i>GCN5</i>	27
<i>SPT7</i>	29
<i>ADA2</i>	28
<i>SGF29</i>	28
<i>HFI1</i>	30
<i>SPT20</i>	29
<i>GAL11</i>	27
<i>ROX3</i>	29
<i>SOH1</i>	27
<i>SRB2</i>	26
<i>MED2</i>	27
<i>CSE2</i>	27
<i>SSN8</i>	25

Gendeletion	Ø
<i>SSN2</i>	24
<i>SIN4</i>	25
<i>SNF5</i>	26
<i>NPL6</i>	27
<i>HTL1</i>	24
<i>PAF1</i>	34
<i>CTR9</i>	30
<i>THO2</i>	31
<i>RPB4</i>	28
<i>RPB9</i>	29
<i>CTK1</i>	33
<i>CTK3</i>	31

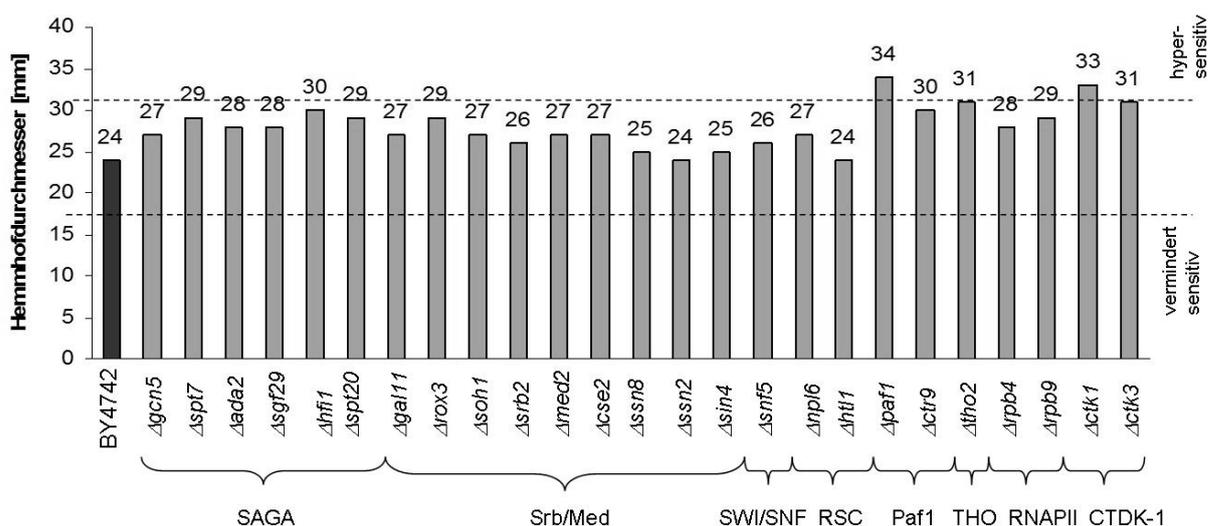


Abbildung 42: K1-Sensitivität der im Deletionscreen als K28-hypersensitiv oder -resistent klassifizierten Mutanten. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben. Mutanten mit einem Hemmhofdurchmesser ≥ 31 mm gelten als hypersensitiv, solche mit ≤ 17 mm als signifikant vermindert sensitiv. Ebenfalls angegeben sind die Komplexe, in denen das jeweils deletierte Protein vorkommt.

Es zeigte sich, dass sowohl alle K28-hypersensitiven als auch alle K28-resistenten Mutanten eine deutlich erhöhte K1-Sensitivität aufwiesen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Deletion in allen Fällen zu einer allgemein erhöhten Sensitivität gegenüber toxischen Substanzen geführt hat.

3.2.3 Überexpressionsstudien zur Identifikation möglicher K28-„Target“-Proteine

Neben der Analyse von Deletionsmutanten stellt die Genüberexpression eine weitere elegante Methode dar, um den Effekt von K28 auf den Zellzyklus von *S. cerevisiae* aufzuklären. So ist z.B. vorstellbar, dass bei Überexpression eines der K28-„Targets“ das Toxin „austitriert“ wird und die Zellen weniger sensitiv oder sogar resistent reagieren.

Reiter konnte bereits zeigen, dass die Sensitivität gegenüber K28 bei Überexpression der G1/S-Zyklone deutlich verändert ist. Die Überexpression von Cln1p und Cln3p führte in dem *S. cerevisiae* Stamm 192.2d zu einer starken Verminderung der Sensitivität. Eine Cln2p-Überexpression resultierte in einer vollständigen K28-Resistenz (Reiter 2004), weswegen der Fokus der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zunächst auf diesem Zyklus lag. Bei den damaligen Versuchen stand die Expression von Cln2p unter der Kontrolle des konstitutiven *TP11*-Promotors. Da es sich aus diesem Grund um eine Zellzyklus-unabhängige Überexpression handelte, sollte zunächst überprüft werden, ob eine Überexpression von Cln2p unter Kontrolle des eigenen *CLN2*-Promotors ebenfalls zu einer K28-Resistenz führt. Dazu wurde die Sequenz, welche den *CLN2*-Promotor und den *CLN2*-ORF einschließt, mit den Primern 26 und 27 aus genomischer DNA amplifiziert. Stuart & Wittenberg (1994) konnten zeigen, dass die Sequenz bis 610 bp „upstream“ des *CLN2*-Startcodons sämtliche *cis*-aktivierenden Elemente einschließt und zur *CLN2*-Expression ausreichend ist. Das Amplifikat *PCLN2* wurde zur Sequenzierung in den Vektor pSTBlue-1 zwischenkloniert, mittels *NotI/BglII*-Verdau ausgeschnitten und in den ebenfalls *NotI/BglII*-verdauten Vektor pPGK-RAS ligiert. Das so entstandene Plasmid pPCLN2 wurde zur Transformation des *S. cerevisiae* Stammes 192.2d verwendet und die transformierten Hefen im MBA getestet. Zur Kontrolle wurde der Wildtypstamm 192.2d ebenfalls im SC-MBA getestet (Tabelle 26).

Tabelle 26: Sensitivität des *S. cerevisiae* Stammes 192.2d bei Überexpression des G1-Zyklins Cln2p. Die Expression von *CLN2* stand in dem Plasmid pPCLN2 unter Kontrolle des *CLN2*-Promotors. Die Sensitivität der Stämme wurde im MBA-Test gegen 100x K28-Toxinkonzentrat bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben. Zum Vergleich wurde der Wildtypstamm ebenfalls getestet.

Stamm	Plasmid	MBA	Ø
192.2d	pPCLN2	Ura d/o Glc	35
192.2d	-	SC Glc	38

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Überexpression von *CLN2* unter Kontrolle des eigenen Promotors zu keiner Resistenz gegenüber K28 führt. Im Vergleich zum Wildtypstamm zeigten die *CLN2*-überexprimierenden Zellen einen Hemmhofdurchmesser, der lediglich 3 mm kleiner war. Bei dem Ausgangsplasmid pPGK handelt es sich um ein 2 μ -„multicopy“-Plasmid, womit die Anzahl an *CLN2*-Genkopien zwischen 60 und 100 liegt (Shaw *et al.* 1993). Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass das Ausbleiben der Resistenz nicht an einer zu geringen Zahl an Genkopien lag, sondern dass tatsächlich die *CLN2*-Transkription durch K28 beeinträchtigt wurde. Eine verminderte K28-Sensitivität trat nur dann auf, wenn die *CLN2*-Überexpression nicht Zellzyklus-reguliert sondern konstitutiv erfolgt.

Interessanterweise führt eine Deletion von *Cln2p* zu keiner erhöhten K28-Sensitivität. Gleiches gilt für die Zykline *Cln1p* und *Cln3p* (Reiter 2004). Erklärbar ist dies durch die Redundanz der Zykline untereinander. Die Funktionen der G1/S-Zykline *Cln1p* und *Cln2p* zeigen eine starke Überlappung, weswegen bei Ausfall eines Zyklins das andere dessen Funktionen übernehmen kann (Miller & Cross 2001). Aus diesem Grund wurde die $\Delta cln1\Delta cln2$ Doppelmutante CWY747 im Agardiffusionstest auf K28-Sensitivität untersucht und der Hemmhof mit dem des isogenen Wildtypstamms CWY231 verglichen (Tabelle 27).

Tabelle 27: K28-Sensitivität der $\Delta cln1 \Delta cln2$ Doppelmutante CWY747 und Vergleich mit dem isogenen Wildtypstamm CWY231. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben.

Stamm	Relevanter Genotyp	\emptyset
CWY747	$\Delta cln1\Delta cln2$	25
CWY231	<i>CLN1 CLN2</i>	21

Eine Deletion beider G1/S-Zykline *Cln1p* und *Cln2p* führte nur zu einer geringen Erhöhung der K28-Sensitivität. Somit kann eine Inhibierung der Transkription der G1/S-Zykline nicht den alleinigen Wirkmechanismus von K28 darstellen, zumal die Deletion beider Zykline *Cln1p* und *Cln2p* nicht letal ist.

Es liegt die Vermutung nahe, dass der Einfluss von K28 auf die Regulation der G1/S-Transition über eine Inhibierung der G1/S-Zykintranskription hinausgeht. Dem Killertoxin bieten sich weitreichende Möglichkeiten, in das komplexe Netzwerk der G1/S-Transition einzugreifen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Überexpression ausgewählter Regulatoren, die an dem Übergang von der G1- zur S-Phase beteiligt sind, eine Änderung in der K28-Sensitivität hervorrufen kann. Führt die Überexpression einer der Regulatoren zu einer K28-Resistenz, so könnte es sich dabei um ein potentielles „Target“ von K28 α handeln.

Bei den Regulatoren, die zunächst getestet wurden, handelt es sich um die Proteine Swi4p, Swi6p, Mbp1p, Sic1p, Cdc4p und Cdc34p. Diese sind maßgeblich für die Einleitung der S-Phase verantwortlich (Abbildung 43). Eine Überexpression der S-Zykline wurde bereits von Reiter (2004) durchgeführt, weswegen im Rahmen der vorliegenden Arbeit darauf verzichtet wurde. Es zeigte sich keine Änderung in der Sensitivität gegenüber K28 (Reiter 2004).

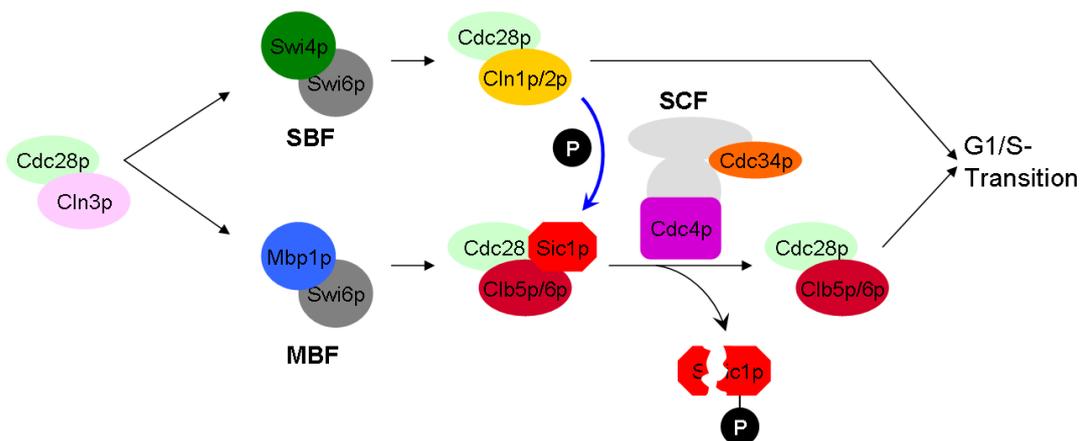


Abbildung 43: Schematische Darstellung der molekularen Vorgänge bei dem Übergang von der G1- zur S-Phase. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Durch die Aktivität des Komplexes bestehend aus Cdc28p und dem G1-Zyclin Cln3p werden zunächst die beiden Transkriptionsfaktoren SBF und MBF aktiviert. Beide enthalten als Transkriptions-aktivierende Komponente das Protein Swi6p sowie unterschiedliche DNA-bindende Proteine. Swi4p ist in dem Transkriptionsfaktor SBF zu finden, Mbp1p in MBF. Die Expression der G1/S-Zykline wird durch SBF aktiviert, die der S-Zykline durch MBF (Ferrezzuelo *et al.* 2010). Alle genannten Zykline werden gleichzeitig exprimiert und interagieren mit Cdc28p, wobei die Zyklin B/Cdc28p-Komplexe zunächst durch den CKI Sic1p gehemmt sind. Erst durch die Aktivität der G1/S-Zyclin/Cdc28p-Komplexe wird Sic1p phosphoryliert. Phosphoryliertes Sic1p stellt ein Substrat des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes SCF dar, welches Sic1p ubiquitiniert und somit für den proteasomalen Abbau markiert. Der SCF-Komplex besteht aus dem Cullin-ähnlichen, strukturgebenden Protein Cdc53p, dem F-Box-bindenden Protein Skp1p, sowie einem von mehreren F-Box-Proteinen. Zur Degradation von Sic1p stellt das F-Box-Protein Cdc4p einen Bestandteil des SCF-Komplexes dar, Cdc34p dient dabei als E2-Ubiquitin-konjugierendes Enzym (Feldman *et al.* 1997). Aufgrund der Degradation von Sic1p werden die Zyklin B/Cdc28p-Komplexe aktiviert, wodurch die S-Phase eingeleitet wird.

Zur Überexpression der G1/S-Regulatoren wurde die Sequenz des jeweiligen Proteins aus genomischer Hefe-DNA mittels PCR amplifiziert und in ein Plasmid zur Sequenzierung

ligiert. In den meisten Fällen war es möglich, die Amplifikate direkt in den Vektor pYES2.1 zu klonieren, der neben der Sequenzierung auch eine Galaktose-getriebene Überexpression in *S. cerevisiae* erlaubt. Die Sequenz von *SWI6* hingegen wurde zunächst in das Sequenzierplasmid pSTBlue-1 eingebracht und nach erfolgreicher Sequenzierung in das Plasmid pYES2.1 umkloniert. Dazu wurde die *SWI6*-Sequenz aus dem Vektor pSTBlue-1-SWI6 durch *XhoI/BamHI*-Verdau ausgeschnitten und in den ebenfalls *XhoI/BamHI*-verdauten Vektor pYES2.1-SIC1 ligiert. Tabelle 28 gibt einen Überblick über die Primer und Vektoren, die bei der Überexpression der G1/S-Regulatoren zum Einsatz kamen.

Tabelle 28: G1/S-Regulatoren, die zur Überexpression in *S. cerevisiae* eingesetzt wurden. Gezeigt sind ebenfalls die zur Amplifikation verwendeten Primer sowie die Plasmide zur Sequenzierung und Expression.

Amplifiziertes Gen	Primer #		Plasmid zur Sequenzierung	Plasmid zur Überexpression
	5'	3'		
<i>SWI4</i>	28	29	pYES2.1	pYES2.1-SWI4
<i>SWI6</i>	30	31	pSTBlue-1	pYES2.1-SWI6
<i>MBP1</i>	32	33	pYES2.1	pYES2.1-MBP1
<i>SIC1</i>	34	35	pYES2.1	pYES2.1-SIC1
<i>CDC4</i>	36	37	pYES2.1	pYES2.1-CDC4
<i>CDC34</i>	38	39	pYES2.1	pYES2.1-CDC34

Alle konstruierten Expressionsvektoren wurden in den *S. cerevisiae* Wildtypstamm BY4742 transformiert und die K28-Sensitivität der transformierten Zellen unter induzierenden Bedingungen im MBA-Test überprüft. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Überexpression an sich schon eine negative Wirkung auf die Zellen ausübt, wurde ebenfalls die Sensitivität gegenüber dem Killertoxin K1 getestet. Zeigten die Zellen bei Überexpression eines Proteins auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem ionophor wirkenden Toxin K1, so war davon auszugehen, dass allein schon die Überexpression die Zellen in ihrer Viabilität schwächt.

Die Ergebnisse der Agardiffusionstests sind in Tabelle 29 gezeigt. Auch in diesem Fall wurde davon ausgegangen, dass ein um 30 % größerer Hemmhof eine hypersensitive K28-Reaktion anzeigt und ein um 30 % verringerter Hemmhof eine signifikant verminderte Sensitivität (vgl. 3.2.2). Eine Überexpression des DNA-bindenden Proteins Mbp1p wirkt sich im wildtypischen Stammhintergrund letal aus. Mutanten, bei denen der „response regulator“ Skn7p deletiert wurde, überleben jedoch solch eine Überexpression (Bouquin *et al.* 1999), weswegen zur Überexpression von Mbp1p nur die $\Delta skn7$ -Mutante und nicht der Wildtypstamm BY4742 getestet werden konnte.

Tabelle 29: K28- und K1-Sensitivität bei Überexpression von Regulatoren der G1/S-Transition. Die Sensitivität der überexprimierenden Stämme wurde im Ura d/o Galaktose-MBA- bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben. Die untransformierten Stämme BY4742 und $\Delta skn7$ wurden im SC Galaktose-MBA-test überprüft. Werte, die in Klammern angegeben sind, zeigen einen kaum erkennbaren Hemmhof an, in dem viele Kolonien eingewachsen waren.

Stamm	Ø	
	K28	K1
BY4742 wt	18	24
BY4742 pYES2.1-SWI4	30	35
BY4742 pYES2.1-SWI6	(19)	35
BY4742 pYES2.1-SIC1	30	35
BY4742 pYES2.1-CDC4	23	34
BY4742 pYES2.1-CDC34	(17)	37
$\Delta skn7$	20	31
$\Delta skn7$ pYES2.1MBP1	22	35

Die Ergebnisse zeigen, dass in allen Fällen eine Überexpression generell die Sensitivität gegenüber dem ionophoren Killerotoxin K1 erhöhte, wodurch davon ausgegangen werden muss, dass unabhängig davon, welcher G1/S-Regulator überexprimiert wurde, die Viabilität der Zellen abnahm. Im Falle von *CDC34*, *MBP1* und besonders *SWI4* und *SIC1* stieg die Sensitivität gegenüber K28 ebenfalls deutlich an. Interessanterweise führte die Überexpression von *SWI6* und *CDC34* zu einer Abnahme der K28-Sensitivität, die sich dadurch äußerte, dass nur ein sehr kleiner Hemmhof zu erkennen war, in dem viele Kolonien heranwuchsen. Die Überexpression beider Proteine macht eine effektivere G1/S-Transition möglich. Swi6p, das eine Untereinheit von SBF und von MBF darstellt, ermöglicht eine erhöhte Expression der G1/S- und der S-Zykline, Cdc34p erlaubt eine effektivere Aktivierung der S-Zyklus/Cdc28p-Komplexe, indem Sic1p effizienter ubiquitiniert und abgebaut wird. Die Ergebnisse unterstreichen die von Reiter (2004) gemachten Beobachtungen, dass Zellen, deren G1/S-Transition durch Überexpression eines G1/S-Regulators schneller von statten geht, weniger sensitiv bis resistent auf K28 reagieren.

Neben den erwähnten G1/S-Regulatoren wurde eine weitere Gruppe an Proteinen daraufhin getestet, ob deren Überexpression eine Änderung in der K28-Sensitivität hervorruft. Es handelte sich dabei um die von Reiter (2004) entdeckten Proteine Elm1p, Cse2p, Ssn8p und Shp1p, deren Deletion zu einer K28-Resistenz führte. Die Gensequenzen lagen bereits korrekt sequenziert in dem Vektor pSTBlue-1 vor, weshalb auf eine Amplifikation und Sequenzierung verzichtet werden konnte. Alle Konstrukte wurden durch *Sall/XbaI*-Verdau aus den Ursprungsvektoren ausgeschnitten und in den ebenfalls *Sall/XbaI*-verdauten Vektor pYES2.1-CLN3 ligiert. Es entstanden dabei die Expressionsplasmide pYES2.1-ELM1, pYES2.1-SSN8, pYES2.1-SHP1 und pYES2.1-CSE2, die zur Überexpression in den

S. cerevisiae Stamm BY4742 transformiert wurden. Alle transformierten Stämme wurden wie zuvor im Agardiffusionstest auf K1- und K28-Sensitivität getestet (Tabelle 30). Mit Ausnahme von *SSN8*, dessen Überexpression keine veränderte K28-Sensitivität induzierte, führten alle anderen Überexpressionen zu einem K28-hypersensitiven Phänotyp. Die K1-Sensitivität war in allen Fällen deutlich erhöht, was auf eine durch die Überexpression verminderte Viabilität der Zellen schließen lässt. Eine grafische Darstellung der K1- und K28-Sensitivitäten aller in der vorliegenden Arbeit getesteten Hefestämme, die ein Zellzyklus-relevantes Regulatorprotein überexprimierten, ist in Abbildung 44 gezeigt.

Tabelle 30: K28- und K1-Sensitivität bei Überexpression ausgewählter Zellzyklusregulatoren. Bei den überexprimierten Proteinen handelt es sich um jene, deren Deletion zu einer K28-Resistenz führte (Reiter 2004). Die Sensitivität der überexprimierenden Stämme wurde im Ura d/o Galaktose-MBA-Test gegen 100x K28- und 100x K1-Toxinkonzentrat bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben. Zum Vergleich wurde der Wildtypstamm BY4742 im SC Galaktose-MBA-Test untersucht.

Stamm	Ø	
	K28	K1
BY4742wt	18	24
BY4742 pYES2.1-ELM1	25	31
BY4742 pYES2.1-SSN8	19	32
BY4742 pYES2.1-SHP1	26	33
BY4742 pYES2.1-CSE2	25	35

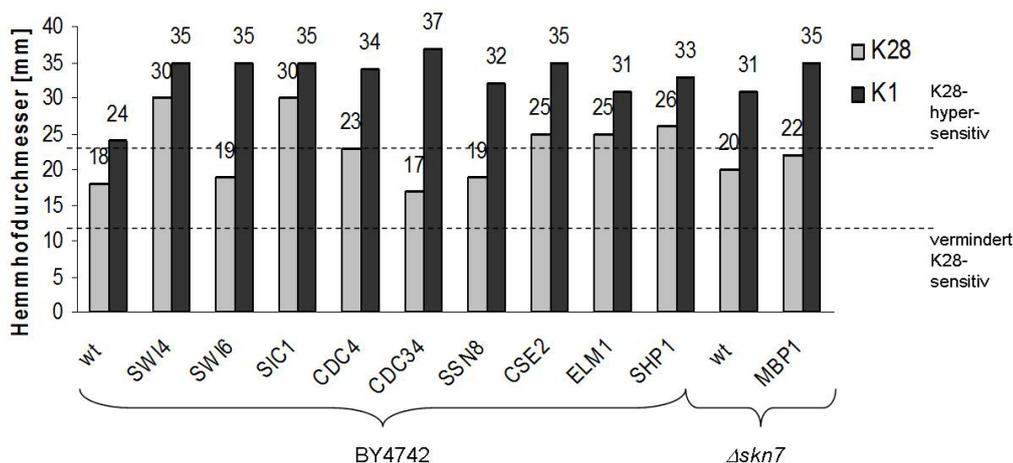


Abbildung 44: K1- und K28-Sensitivität aller getesteten Stämme, die ein mögliches „Target“ von K28 überexprimieren. Die Sensitivität wurde im MBA-Test bestimmt und als Hemmhofdurchmesser in mm angegeben. Ein Hemmhofdurchmesser $\geq 23,4$ mm zeigt eine K28-Hypersensitivität und $\leq 12,6$ mm eine signifikant verminderte Sensitivität an. Als Vergleich sind die Wildtypstämme BY4742 und $\Delta skn7$ mit aufgeführt.

3.2.4 Transkriptomanalyse K28-behandelter Zellen mittels RNA-Seq

Viele der im Rahmen der vorliegenden Arbeit und der von Reiter (2004) gewonnenen Daten legen einen Einfluss von K28 auf die Transkription nahe. Um einen globalen Überblick darüber zu erhalten, welche Gene durch K28-Behandlung herunter- bzw. hochreguliert sind, wurde eine Transkriptomanalyse von K28-behandelten Zellen durchgeführt. Dabei sollten Zellen mit K28 behandelt und zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Toxinzugabe der transkriptionelle Zustand der Zelle ermittelt werden. Die Ergebnisse sollten Aufschluss darüber geben, ob beispielsweise durch K28 spezifisch Gene herunterreguliert werden, die den Übergang von der G1- zur S-Phase regulieren, wodurch sich der terminale Phänotyp K28-behandelter Zellen erklären lässt. Die Transkriptomanalyse sollte mittels RNA-Seq erfolgen. Mit dieser Technik ist es möglich, sämtliche in einer Zelle vorhandenen Transkripte zu sequenzieren und die Expressionsstärke jedes einzelnen Gens zu bestimmen (Wang *et al.* 2009).

In Vorversuchen wurde zunächst überprüft, zu welchem Zeitpunkt nach Toxinzugabe eine toxische Wirkung von K28 zu beobachten ist. Dazu wurde anhand von Abtötungskinetiken der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Zellen einen Wachstumsarrest aufweisen. Zellen des Stammes BY4742 wurden mit K28 inkubiert und über einen Zeitraum von 24 h die optische Dichte der Kultur bestimmt. Es zeigte sich, dass K28-behandelte Zellen das gleiche Wachstumsverhalten aufwiesen wie K28-unbehandelte Zellen. Auch unter Änderung verschiedener Parameter bei der Toxininkubation konnte keine Abtötung bzw. Wachstumsinhibierung durch K28 beobachtet werden (nicht gezeigt).

Generell scheint es so zu sein, dass in Flüssigkulturen die Wirkung von K28 stark herabgesetzt ist, weswegen für solche Versuchsansätze grundsätzlich Sphäroplasten verwendet werden. Diese zeigen eine erhöhte K28-Aufnahme, was sich in einem Wachstumsstopp nach kurzer Zeit widerspiegelt (Reiter 2004, Sendzik 2006). Im Rahmen der Transkriptomanalyse konnten dennoch keine Sphäroplasten zur Toxinbehandlung eingesetzt werden. Ziel des Versuches war es, mögliche Effekte von K28 auf die Expression Zellzyklus-regulatorischer Gene zu untersuchen. Da durch die Sphäroplastierung von Hefezellen, deren Zellzyklus gestört wird (Doi & Doi 1982, Murakami & Livingston 1982), würde dies einen Effekt von K28 möglicherweise überdecken. Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf Hefezellen verwendet, die unter transkriptioneller Kontrolle des Promotors P_{GAL1} das K28-Letalkonstrukt präpro α exprimierten.

Auch mit diesem Stamm wurden Wachstumsuntersuchungen durchgeführt, um den Zeitpunkt der Toxinwirkung näher einzugrenzen. Dazu wurden Zellen des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 pYES2.1-präpro α in Raffinose-Medium ü. N. kultiviert. Am nächsten Tag wurden zweimal 1×10^7 Zellen geerntet und in Galaktose- bzw. Glukose-Medium

resuspendiert. Über einen Zeitraum von 22 h wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die optische Dichte OD_{600} ermittelt (Abbildung 45). Es zeigte sich sehr deutlich, dass die Expression des Letalkonstrukts präpro α die Zellen in ihrem Wachstum inhibierte.

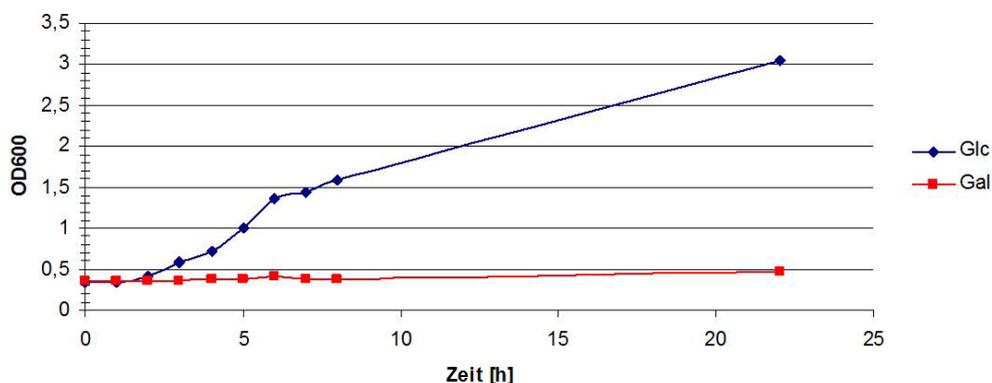


Abbildung 45: Abtötungskinetik des sensitiven *S. cerevisiae* Stammes BY4742 nach Expression des Letalkonstrukts präpro α . Zellen des Stammes BY4742 pYES2.1-präpro α wurden ü. N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert und zweimal 1×10^7 Zellen geerntet. Zur Expression von präpro α wurde ein Ansatz in Ura d/o Galaktose-Medium resuspendiert; für den Kontrollansatz wurde Ura d/o Glukose-Medium verwendet. Zur Expression wurden die Zellen bei 30 °C und 90 rpm inkubiert. Über einen Zeitraum von 22 h wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die optische Dichte OD_{600} bestimmt.

Durch die gezeigte Wachstumskurve konnte zwar die toxische Wirkung des Letalkonstrukts präpro α bestätigt werden, jedoch lies der Versuch keine Aussage über den Zeitpunkt der Toxinwirkung zu. Um diesen Zeitpunkt näher einzugrenzen, wurden „Toxin-shut-off“-Studien durchgeführt. Dabei wurde die Expression des Letalkonstrukts präpro α durch Galaktoseinduktion eingeleitet und zu verschiedenen Zeitpunkten durch Glukosezugabe wieder gestoppt. Dadurch sollte getestet werden, ob ab einer bestimmten Expressionsdauer die Zellen unweigerlich abgetötet werden. Innerhalb dieses Zeitrahmens sollte demnach auch die Wirkung des Toxins eingetreten sein. Zellen des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 pYES2.1-präpro α wurden in Raffinose-Medium kultiviert, zur Induktion in Galaktose-Medium resuspendiert und in eine 96-Well-Platte verteilt. Zwischen den Zeitpunkten T=0 h und T=7 h wurde zu jeder Stunde eine Glukosestammlösung hinzupipettiert (Endkonzentration 2 %), um die Expression von präpro α abzuschalten. Gleichzeitig wurde innerhalb von 24 h stündlich von allen Zellsuspensionen die optische Dichte OD_{600} bestimmt. Als Kontrolle wurde der *S. cerevisiae* Stamm BY4742 pYES2.1-leer verwendet, der analog behandelt wurde. Die grafische Auswertung der Daten ist in Abbildung 46 gezeigt.

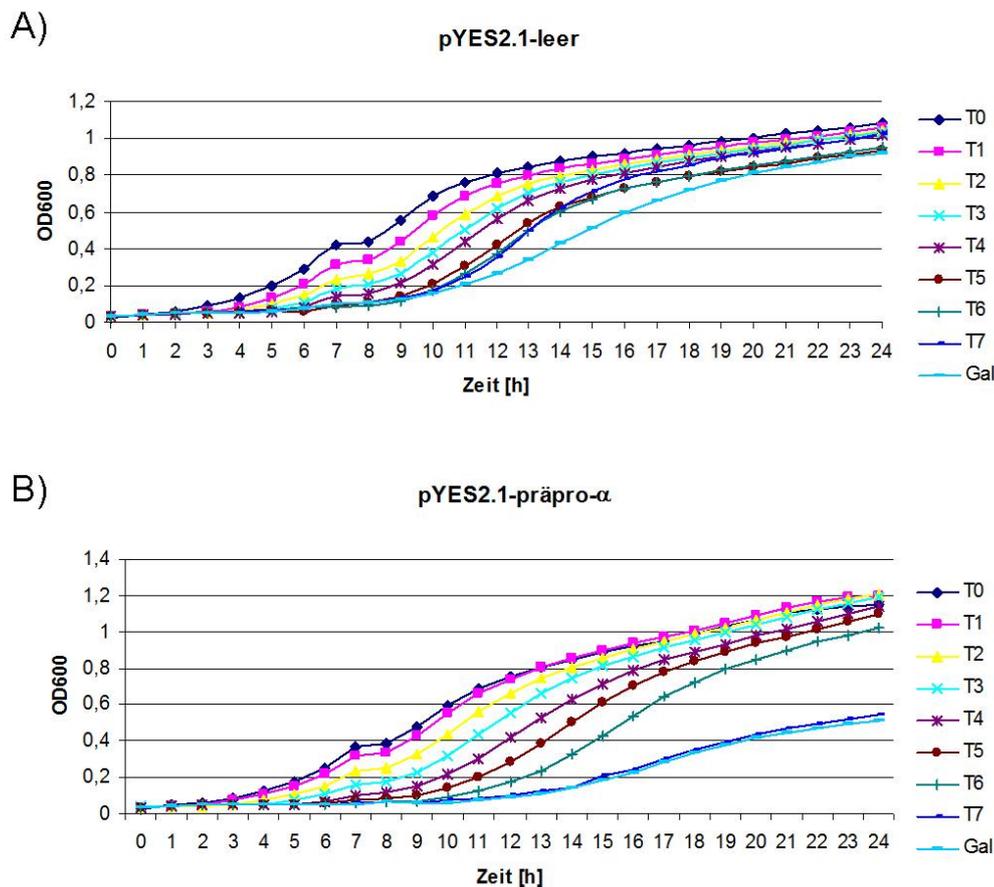


Abbildung 46: "Shut-Off"-Studien zur Bestimmung der Toxinwirkung des K28-Letalkonstrukts präpro α . Hefezellen des Kontrollstammes BY4742 pYES2.1-leer (A) bzw. des präpro α exprimierenden Hefestammes BY4742 pYES2.1-präpro α (B) wurden ü. N. in Ura d/o Raffinose-Medium kultiviert. Die Kulturen wurden in Ura d/o Galaktose-Medium überführt und auf eine 96-Well-Platte verteilt. Zum Ausschalten der Expression wurde in einem Zeitrahmen von 7 h stündlich eine 20 %ige Glukosestammllösung (Endkonzentration 2 %) zugegeben. Gleichzeitig wurde stündlich die optische Dichte OD₆₀₀ bestimmt (Dreifachbestimmung). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Toxin-„shut-off“-Versuche zeigten, dass Zellen die Expression des Letalkonstrukts präpro α überlebten, wenn innerhalb von 6 h die Expression durch Glukosezugabe wieder ausgeschaltet wird. Nach 7stündiger präpro α -Expression und anschließendem „Shut-Off“ verhalten sich die Zellen hingegen wie die Kontrollkultur, bei der kein „Shut-Off“ stattgefunden hat. Dies macht deutlich, dass diese Zellen die toxische Wirkung von präpro α nicht überlebten, obwohl die Toxinexpression nach 7 h ausgeschaltet wurde. Es ist zu erwarten, dass auch innerhalb dieses Zeitrahmens die spezifische molekulare Wirkung von K28 α innerhalb der Zelle erfolgte, sodass ein Unterschied im transkriptionellen Zustand der Zelle nachweisbar sein sollte. Die Tatsache, dass die Kontrollkultur ohne „Shut-Off“ eine leichte Zunahme in der optischen Dichte zeigt, wurde mehrfach beobachtet. Es handelt sich hierbei möglicherweise um Zellen, bei denen trotz Galaktoseinduktion kein Toxin produziert wurde oder die Zellen überlebten infolge einer spontanen Mutation die Toxinexpression.

Aus den Vorversuchen wurde deutlich, dass innerhalb von 7 h eine molekulare Wirkung von K28 α bei Expression des Letalkonstrukts präpro α innerhalb der Zelle auftritt. Aus diesem Grund wurde die Expression des Letalkonstrukts präpro α in Zellen zur Transkriptom-Analyse mittels RNA-Seq 7 h mit Galaktose induziert. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte am „Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research Saarland (HIPS)“. Dabei wurde zunächst die Qualität der RNA-Proben überprüft. In allen Proben entsprach sowohl die RNA-Menge als auch die RNA-Qualität den für die RNA-Seq benötigten Anforderungen. Im weiteren Verlauf wurde aus den Proben die mRNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Nach einer Fragmentierung der cDNA-Moleküle auf eine Größe von etwa 200 bp und der Anfügung von Adaptersequenzen wurden sämtliche cDNA-Fragmente mittels Illumina-Sequenzierung ansequenziert. Die Länge der dabei generierten „single-reads“ betrug 51 nt. Dabei findet die Sequenzierung in nur eine Richtung statt, in diesem Fall von 5' zum 3'-Ende. Die Gesamtzahl der „reads“ betrug in allen Proben zwischen 18,7 und 28 Mio. Die weitere bioinformatische Bearbeitung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der frei zugänglichen Software „Tophat“ (Trapnell *et al.* 2010, Trapnell *et al.* 2012). In einem als „mapping“ bezeichneten ersten Schritt wurden dabei die generierten „reads“ jeder Probe der Genomsequenz des *S. cerevisiae* Stammes S288c zugeordnet, welche frei im Internet verfügbar ist. Bei diesem Stamm handelt es sich um den Elternstamm des in diesem Versuch verwendeten Stammes BY4742. Die Unterschiede betreffen lediglich wenige Stoffwechselfgene, die im Falle von BY4742 deletiert wurden, um diese als Selektionsmarker zu verwenden (Brachmann *et al.* 1998). Die Genomsequenzen beider Stämme sind mit Ausnahme dieser Stoffwechselfgene identisch. Tabelle 31 gibt einen Überblick über die Gesamtzahl der „reads“ in jeder Probe sowie jeweils die Zahl an „reads“, die dem Referenzgenom zugeordnet werden konnte.

Tabelle 31: Zuordnung der "reads" zu dem Referenzgenom im Rahmen der RNA-Seq Analyse

	BY4742 pYES2.1-leer			BY4742 pYES2.1-präpro α		
	T0	T2	T7	T0	T2	T7
counted fragments	17.146.972	20.263.692	15.310.944	19.450.902	18.348.000	22.314.743
-uniquely mapped	16.027.383	19.151.290	14.399.142	17.648.663	16.490.104	20.451.640
-unique exon reads	15.986.495	19.099.492	14.357.777	17.599.836	16.440.200	20.386.746
-non-specifically	1.119.589	1.112.402	911.802	1.802.239	1.857.896	1.863.103
uncounted fragments	3.419.243	3.752.974	3.460.509	3.200.541	4.580.255	5.712.491
total fragments	20.566.215	24.016.666	18.771.453	22.651.443	22.928.255	28.027.234

Von der Gesamtzahl an „reads“ („total fragments“) wurden für die weitere bioinformatische Analyse nur die Sequenzen genutzt, die genau einmal dem Referenzgenom zuzuordnen waren („uniquely mapped“), da nur mit diesen „reads“ eine Analyse der differentiellen Genexpression möglich ist. Die restliche Zahl an „reads“ konnte entweder dem Referenzgenom nicht zugeordnet werden („uncounted fragments“) oder ein „read“ konnte mehr als einer Gensequenz zugeordnet werden („non-specifically“). Letzteres ist im Falle von *S. cerevisiae* recht häufig der Fall, da viele Gene in diesem Organismus überlappen. Bei der Illumina-Sequenzierung ist es nicht möglich, die sequenzierte cDNA-Sequenz dem Plus- bzw. dem Minusstrang zuzuordnen, weswegen bei zwei überlappenden Genen keine Aussage darüber getroffen werden kann, zu welchem Gen ein „read“ gehört. Eine falsche Zuordnung würde die Ergebnisse bei einer differentiellen Genexpressionsanalyse verfälschen, weswegen solche „reads“ verworfen werden. Weiterhin wurden alle „reads“ ausgeschlossen, die einer Intronsequenz zugeordnet wurden. Es wurden somit für die Analyse der Genexpression jeweils die „reads“ verwendet, die einer Exonsequenz zuzuordnen waren („unique exon reads“). Infolge dessen wurden von den 6.353 im Genom von *S. cerevisiae* S288c vorhandenen Genen 5.900 zur weiteren Auswertung erfasst. Nicht erfasst wurden u.a. auch alle mitochondriell kodierte Gene sowie alle tRNA-Gene.

Die Analyse der differentiellen Genexpression erfolgte mit der frei zugänglichen Software „Cufflinks“ (Trapnell *et al.* 2010, Trapnell *et al.* 2012). Dabei wurde von jedem Hefegen der RPKM-Wert („reads per kilobase of transcript per million mapped reads“) bestimmt. Bei diesem Wert wird die Gesamtzahl an „reads“, die einem Gen zugeordnet wurden, gegen die Länge des Transkriptes und die Gesamtzahl an „reads“ in der Probe normiert, sodass die Expressionsstärke dieses Gens in verschiedenen Proben verglichen werden kann (Mortazavi *et al.* 2008).

Im Weiteren fand eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten statt, bei der die Zahl an Genen bestimmt wurde, die durch K28 signifikant hoch- bzw. herunterreguliert wurden. Dazu wurde das Programm „Significance analysis of microarrays“ (SAM) herangezogen (Tusher *et al.* 2001). Die Analyse ergab, dass durch Expression des Letalkonstrukts präpro α insgesamt 75 Gene hoch- und 1.237 Gene herunterreguliert wurden. In einem weiteren Auswertungsschritt wurden mit Hilfe des „GO Slim Mappers“ der SGD-Datenbank die signifikant hoch- bzw. herunterregulierten Gene einem biologischen Prozess zugeordnet. Auf diese Weise sollte analysiert werden, ob durch K28 die Transkription von Genen, die spezifisch an einem oder mehreren Prozessen (z.B. G1/S-Transition) beteiligt sind, herunterreguliert werden.

Insgesamt konnten die durch K28 hochregulierten Gene 59 biologischen Prozessen zugeordnet werden. Eine genaue Auflistung der Prozesse und der eingruppierten Gene ist

im Anhang zu finden. Abbildung 47 zeigt die Prozesse, denen mindestens 5 Gene zugewiesen wurden.

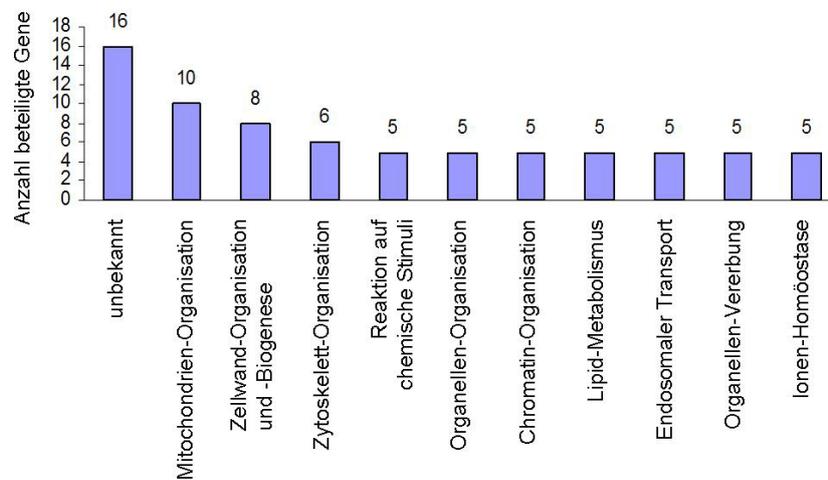


Abbildung 47: Biologische Prozesse, denen die meisten durch K28 hochregulierten Gene zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung der mittels RNA-Seq gefundenen, signifikant hochregulierten Gene erfolgte mit Hilfe des „GO Slim Mappers“ der SGD-Datenbank.

Die 1.237 Gene, die durch K28 herunterreguliert wurden, konnten in insgesamt 99 biologische Prozesse eingruppiert werden. Abbildung 48 gibt einen Überblick über die Prozesse, an denen mindestens 50 Gene beteiligt waren. Die komplette Auflistung der 99 Prozesse sowie die jeweils zugeordneten Gene sind im Anhang zu finden.

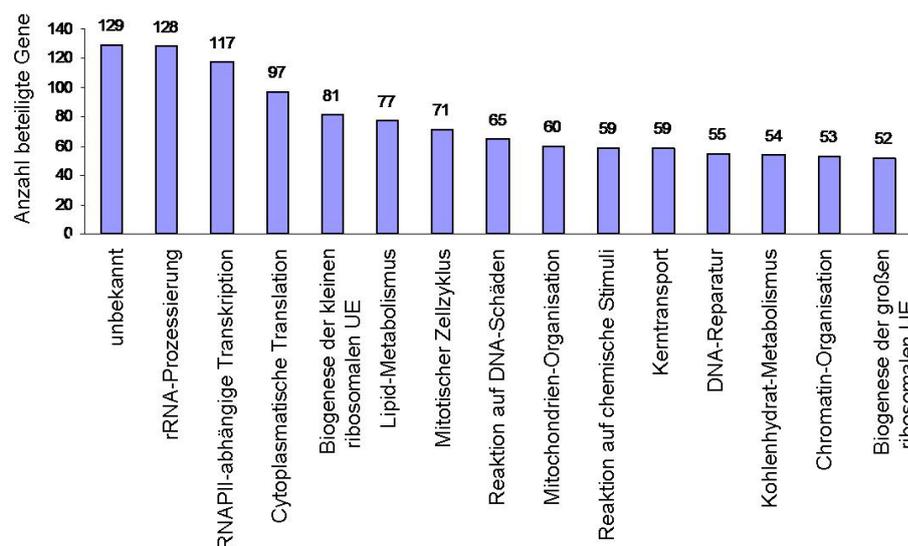


Abbildung 48: Biologische Prozesse, denen die meisten durch K28 herunterregulierten Gene zugeordnet werden konnten. Die Zuordnung der mittels RNA-Seq gefundenen, signifikant herunterregulierten Gene erfolgte mit Hilfe des „GO Slim Mappers“ der SGD-Datenbank.

Die Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq offenbarte einen deutlichen Einfluss auf die globale Transkription in Toxin-behandelten Hefezellen. Über 20 % der Gene von *S. cerevisiae* wurden infolge der K28-Wirkung herunterreguliert. Um weiter zu bestimmen, ob die Transkriptionshemmung auch die Ursache für den Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase darstellt, wurde untersucht, ob solche Gene herunterreguliert wurden, die durch die Transkriptionsfaktoren SBF und MBF reguliert werden. Diese sind maßgeblich für die G1/S-Transition verantwortlich und aktivieren beim „Start“-Übergang die Expression von etwa 200 Genen, wodurch die Zellzyklusmaschinerie gestartet wird (Cho *et al.* 1998, Spellman *et al.* 1998, Ferrezuelo *et al.* 2010, Eser *et al.* 2011). Eine systematische Charakterisierung der „Target“-Gene von SBF und MBF wurde von Ferrezuelo *et al.* (2010) durchgeführt. Diese Daten bildeten die Grundlage zum Vergleich mit den Ergebnissen aus der RNA-Seq Analyse. In Tabelle 32 sind alle durch K28 herunterregulierten Gene aufgeführt, deren Transkription laut Ferrezuelo *et al.* durch SBF- bzw. MBF-reguliert wird.

Tabelle 32: SBF- bzw. MBF-regulierte Gene, deren Transkription durch K28 gehemmt wird.

	Gene
SBF	<i>MNN1, TOS6, PRY2, CSI2, CLN2, GAS1, GIN4, TOS4, PSA1, WSC2, CLN1, SCW10, SWE1, YOX1, GIC2, MCD1, RNR1, PDR16, MSB2, AXL2, NRM1, EXG1, NUD1, HCM1, RSR1, SPT21, ACM1, RTT107, PMI40, ALK2, CLB6, SCP160, RAD27, POL30, BBP1, SKG6, PDS1, ECM33, ERG4, PMT2, SVL3, SMF2, SPA2, MGM101, ERP2</i>
MBF	<i>SPT21, RAD27, CDC45, CDC21, SEN34, MCD1, MSH6, RTT107, GIN4, ACM1, SKG6, RAD53, POL32, RAD51, SHO1, PRI2, HCM1, PMS1, RNR1, GIC2, SPA2, PDR16, POL30, ELG1, CLB6, SCW10, YMR144W, MKC7, CLN1, BUD2, YDL157C, RAD5, SWE1, EXG1, RSR1, POL3, ERV25, AXL2, CSM3, MIF2, OGG1, RIF1, MNN1, DBF4, SLK19, STB1, BIM1, PDS1, YOX1</i>

Insgesamt wurden von 94 SBF-regulierten Genen (Ferrezuelo *et al.* 2010) 45 und somit 47,87 % infolge der K28-Wirkung in ihrer Transkription gehemmt. Darunter befanden sich auch die G1/S-Zykline *CLN1* und *CLN2*, deren K28-induzierte Expressionshemmung bereits von Reiter (2004) beschrieben wurde. Von den 111 MBF-regulierten „Target“-Genen (Ferrezuelo *et al.* 2010) zeigten 49 (44,14 %) eine Abnahme in ihrer Transkriptmenge.

Die Daten aus der Transkriptomanalyse legen nahe, dass die durch K28 verursachte Inhibition der Transkription eher unspezifisch erfolgt und dass Zellzyklusregulatoren, die den Übergang von der G1- zur S-Phase steuern, vermutlich unspezifisch herunterreguliert werden.

4 Diskussion

Die Produktion von Killertoxinen, die sensitive Hefen derselben oder einer anderen Gattung abtöten, ist ein weit verbreitetes Phänomen bei einer Vielzahl von Hefestämmen verschiedener Gattungen. Der dabei am häufigsten zu beobachtende Abtötungsmechanismus beruht auf der Bildung von Poren in der Plasmamembran der Zielzelle, was zum Ausstrom von Ionen und somit letztendlich zum Zelltod führt. K1 und K2, zwei der vier bei *S. cerevisiae* bekannten Killertoxine, zeigen solch eine ionophore Wirkung (Bussey 1991, Novotná *et al.* 2004). Neben dem erst kürzlich entdeckten Killertoxin *Klus*, dessen Wirkung bisher unbekannt ist (Rodríguez-Cousino *et al.* 2011), stellt K28 ein weiteres Killertoxin von *S. cerevisiae* dar, dessen Abtötungsmechanismus sich erheblich von demjenigen porenbildender Toxine unterscheidet. Sensitive Hefen zeigen nach K28-Behandlung einen Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase und eine irreversible Hemmung der DNA-Synthese (Schmitt *et al.* 1996). Neben K28 sind nur zwei weitere Zellzyklusarretierende Killertoxine bekannt. Zymocin aus *K. lactis* und PaT aus *P. acaciae* schneiden als tRNA-Anticodonnukleasen spezifische tRNA-Moleküle, was in einem Zellzyklusarrest in der späten G1- bzw. frühen S-Phase resultiert (Lu *et al.* 2005, Studte *et al.* 2008, Klassen *et al.* 2008).

Das viral kodierte Killertoxin K28 wird als α/β -Heterodimer von Toxin-produzierenden Zellen sezerniert und von sensitiven Hefezellen internalisiert. Nach der Bindung des Toxins an α -1,3-Mannoproteine in der Zellwand der Zielzelle transloziert es zu dem Sekundärrezeptor auf Ebene der Plasmamembran (Schmitt & Radler 1987). Dabei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um den zellulären K/HDEL-Rezeptor Erd2p, der das am β -C-Terminus befindliche ER-Retentionssignal HDEL bindet und nach Endozytose das Toxin über den Golgi-Apparat retrograd in das ER befördert (Dausend 2010). Die Retrotranslokation von K28 aus dem ER in das Zytosol erfolgt vermutlich über den Sec61-Komplex. Nach Spaltung der Disulfidbrücke zwischen der α - und β -Untereinheit wird K28 β ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, wohingegen K28 α einer Degradation entgeht und einen Zellzyklusarrest initiiert (Schmitt & Breinig 2006). Die arretierten Hefezellen zeigen einen terminalen Phänotyp, der mit einer mittelgroßen Knospe ohne eingewanderten Zellkern und ohne Ausbildung eines Spindelapparates einhergeht. Durch Hemmung der DNA-Synthese weisen die Zellen einen präreplikativen DNA-Gehalt auf (Schmitt *et al.* 1996). Der so zu beobachtende Zellzyklusarrest ist untypisch, da die Ausbildung einer Knospe auf einen Arrest nach der S-Phase hindeutet, wohingegen der DNA-Gehalt von 1n einen Arrest vor der S-Phase anzeigt. Das Erscheinungsbild legt somit nahe, dass K28 mehrere Vorgänge angreift, die in verschiedenen Zellzyklusphasen vonstatten gehen.

Grundlegende Arbeiten zur Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von K28 wurden bereits von Reiter (2004) durchgeführt. Zwei Schwerpunkte seiner Untersuchungen beinhalteten die Aufklärung der terminalen Lokalisation von K28 α und Versuche zum K28 α -induzierten Zellzyklusarrest. In der vorliegenden Arbeit wurden auf Grundlage dieser Ergebnisse weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung der terminalen Lokalisation von K28 α und dessen Wirkung auf den Zellzyklus von *S. cerevisiae* durchgeführt.

4.1 Bestimmung der terminalen Lokalisation von K28 α

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob der Nukleus den terminalen Wirkungsort von K28 α darstellt. Zahlreiche bisherige Untersuchungen legen nahe, dass K28 α erst im Zellkern seine toxische Wirkung entfaltet. Als Hauptargument kann dabei der durch K28 induzierte Zellzyklusarrest angesehen werden. Anders als bei höheren eukaryotischen Zellen bleibt die Kernhülle von *S. cerevisiae* während des gesamten Zellzyklus intakt, ein Phänomen, das als „geschlossene Mitose“ bezeichnet wird (Byers 1981, Güttinger *et al.* 2009). Aufgrund dessen findet auch nahezu die gesamte Regulation des Zellzyklus im Hefenukklus statt. Ein Kernimport von K28 α scheint daher am wahrscheinlichsten, da sich dem Toxin dort vielfältige Angriffspunkte bieten. So handelt es sich auch mit Ausnahme von Zds1p bei allen bislang identifizierten, potentiellen Interaktionspartnern (Apc2p, Spt15p, Prp42p, Ctr9p und YML081w) von K28 α um nukleäre Proteine (Reiter 2004). Ein weiteres Argument für eine terminale Kernlokalisation von K28 α stellt der Immunitätsmechanismus K28-produzierender Zellen dar. Die Vermittlung der Immunität erfolgt auf Ebene des Zytoplasmas. Von außen aufgenommenes Toxin wird dort durch den Toxinvorläufer komplexiert und proteasomal abgebaut (Breinig *et al.* 2006). K28-produzierende Zellen verhindern somit einen potentiellen Eintritt der α -Untereinheit in ihren eigenen Zellkern, wodurch sie vor einem Zellzyklusarrest geschützt sind. Ebenso konnte gezeigt werden, dass Zellen, die gleichzeitig wildtypisches Vollängen-K28 sowie ein sonst toxisches NLS-K28 α -Konstrukt exprimieren, ebenfalls vor der toxischen Wirkung geschützt sind (Reiter 2004). Es ist auch in diesem Fall zu vermuten, dass das toxische NLS-K28 α -Konstrukt im Zytosol von dem Vollängentoxin abgefangen wird. Zwar kann auch das Vollängentoxin mit einem Molekulargewicht von 38 kDa prinzipiell frei in den Zellkern diffundieren, jedoch muss ein Abfangen der toxischen K28 α -Variante aller Wahrscheinlichkeit nach bereits im Zytosol erfolgen, da bereits wenige K28 α -Moleküle für ein effektives Abtöten der Zellen ausreichen (Reiter 2004). In beiden Fällen – sowohl bei endozytotischer Aufnahme von K28, als auch bei intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts NLS-K28 α – gibt es im Zytoplasma dieser

Zellen daher stets einen geringen Anteil an K28 α -Molekülen, die noch der Komplexbildung durch das Volllängentoxin entgangen sind. Ein potentiell zyttoplasmatisches Zielprotein von K28 α würde somit trotzdem attackiert werden. Die Tatsache, dass diese Zellen eine K28-Behandlung bzw. Expression des toxischen NLS-K28 α -Konstrukts überleben, zeigt, dass die Inhibierung der Zellzyklusmaschinerie und die Vermittlung der Immunität in voneinander getrennten Kompartimenten erfolgen müssen.

Der Transport von Molekülen aus dem Zytosol in den Nukleus und umgekehrt erfolgt durch die in die doppelte Kernhülle eingebetteten Kernporenkomplexe (NPC). Bei den NPCs handelt es sich um Multiproteinkomplexe, die aus multiplen Kopien der etwa 30 verschiedenen Nukleoporine (NUPs) zusammengesetzt sind und in *S. cerevisiae* ein Molekulargewicht von etwa 66 MDa besitzen (Rout & Blobel 1993). Diese bilden eine Kernpore mit einem Durchmesser von 90 bis 100 Å, die den Durchtritt von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 40 bis 50 kDa erlaubt (Hoelz *et al.* 2011). Der Transport größerer Moleküle erfolgt mit Hilfe von Karyopherinen. Viele kleine kernständige Proteine müssen ebenfalls aktiv in den Zellkern transportiert werden. Zum aktiven Transport von Proteinen in den Zellkern benötigen diese eine Kernlokalisationssequenz (NLS), der Transport aus dem Kern in das Zytosol erfolgt mittels einer Kernexportsequenz (NES) (Stewart 2007).

Reiter (2004) untersuchte erstmals, ob und wie K28 α in den Hefezellkern gelangt. Zum direkten Nachweis wurden Zellkerne K28-behandelter Zellen isoliert und versucht, K28 α in anschließenden Western-Analysen mit Hilfe eines polyklonalen K28 α -Antikörpers zu detektieren. Ein Nachweis von K28 α in den aufgereinigten Zellkernrohextrakten konnte dabei nicht erbracht werden. Zwar stand mittlerweile ein neuer K28 α -Antikörper zur Verfügung, jedoch wurde auf den Versuch, K28 α in Zellkernrohextrakten toxinbehandelter Zellen nachzuweisen, im Rahmen der vorliegenden Arbeit verzichtet. Eine Problematik bei dieser Vorgehensweise liegt in der Tatsache begründet, dass K28 retrograd den Sekretionsweg durchläuft und somit auch im ER lokalisiert. Da das Lumen des ER nahtlos in das der Kernmembran übergeht, muss davon ausgegangen werden, dass K28-Moleküle stets auch in der Kernmembran zu finden sind. Bei einer Kernisolierung werden die noch intakten Hefenuklei durch Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen Zellbestandteilen getrennt (Ide & Saunders 1981). Eine vollständige Trennung zwischen Nukleoplasma und der Kernmembran ist allerdings methodisch nicht zu erreichen, sodass die erhaltenen Kernrohextrakte immer mit Proteinen „verunreinigt“ sind, die in der Kernmembran bzw. in deren Lumen vorhanden sind. Bei einem Nachweis von K28 α in Kernextrakten könnte somit nie ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um Toxinmoleküle handelt, die im Lumen der Kernmembran lokalisieren.

Bestimmung der Lokalisation von K28 α mit Hilfe mikroskopischer Techniken

Zum direkten Nachweis von K28 α im Zellkern wurden daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit mikroskopische Techniken eingesetzt. Eine einfache und elegante Methode zur mikroskopischen Detektion von Proteinen in zellulären Kompartimenten stellt die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IIF) dar (Roberts *et al.* 1991). Dabei bleiben die subzellulären Strukturen erhalten, sodass eine genaue Bestimmung der Lokalisation möglich ist. Auf diese Weise sollte eine Lokalisation von K28 α im Hefenuklear bestätigt werden. Zellen eines sensitiven *S. cerevisiae* Stammes wurden dazu mit K28-Toxin behandelt, zur IIF präpariert und im Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Als primäre Antikörper fanden dabei ein polyklonaler K28-, sowie ein polyklonaler K28 α -Antikörper Anwendung. In beiden Fällen zeigten die behandelten Zellen starke Fluoreszenzsignale, die in der gleichen Verteilung und Fluoreszenzintensität auch bei den unbehandelten Zellen zu sehen waren. Eine Sphäroplastierung der Zellen vor der Inkubation mit K28 führte zu dem gleichen Ergebnis. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Signale, die im Fluoreszenzmikroskop detektiert wurden, auf Kreuzreaktionen der primären Antikörper zurückzuführen sind. Zur Herstellung des Antikörpers gegen das Vollängentoxin wurden Kaninchen mit aufgereinigtem K28-Toxinkonzentrat immunisiert (Guida 2007). Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass das eingesetzte Serum neben polyklonalen K28-Antikörpern weitere, gegen Hefepoteine gerichtete Antikörper enthielt, die die Kreuzreaktion hervorriefen. Western-Analysen, in denen dieser Antikörper eingesetzt wurde, zeigten stets Signale im hochmolekularen Bereich über 120 kDa (nicht gezeigt). Zur Herstellung des Antikörpers gegen die K28 α -Untereinheit wurden Kaninchen mit einem synthetisch hergestellten Peptid, das das C-terminale Ende von K28 α repräsentierte, immunisiert. Durch die Verwendung des Peptids sollte eine möglichst hohe Spezifität erreicht werden, jedoch trat bei Verwendung des K28 α -Antikörpers in Western-Analysen stets eine unspezifische Bande bei etwa 34 kDa auf. Beide Antikörper, die bei der IIF zum Einsatz kamen, erwiesen sich daher aufgrund ihrer Kreuzreaktionen als ungeeignet zum immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von K28 bzw. K28 α . Eine weitere Problematik stellt die Menge an aufgenommenen Toxinmolekülen dar. Diese ist möglicherweise für eine Detektion mittels IIF zu gering bzw. so niedrig, dass Fluoreszenzsignale der Antikörper-markierten Toxinmoleküle durch die Signale der Kreuzreaktionen überdeckt wurden. Um die Menge an Toxinmolekülen innerhalb der Zelle zu erhöhen, wurde das Letalkonstrukt präpro α intrazellulär exprimiert. Obwohl der so hergestellte Hefestamm lediglich eine im Genom integrierte Genkopie der K28 α -Variante enthielt, reagierten die Zellen sensitiv bei Induktion der Expression. Dies unterstreicht die Vermutung, dass nur wenige K28 α -Moleküle für eine effektive Wirkung nötig sind. Der Nachweis des intrazellulären Letalkonstrukts präpro α mittels IIF konnte dennoch nicht

erbracht werden. Auch in diesem Fall waren im Fluoreszenzmikroskop lediglich Signale zu beobachten, die auf Kreuzreaktionen des K28 α -Antikörpers zurückzuführen sind. Zusätzliche intrazelluläre Signale in den induzierten Zellen waren nicht erkennbar. Dies kann auf die hohe toxische Wirkung von K28 α zurückgeführt werden. Schon frühere Versuche machten deutlich, dass zur Induktion des Zellzyklusarrests möglicherweise nur wenige K28 α -Moleküle nötig sind (Reiter 2004). Auch war es bisher nicht möglich, das Letalkonstrukt präpro α im Western-Blot nachzuweisen. Zum Nachweis der Expression dieses Konstrukts ist dessen radioaktive Markierung erforderlich (Müller, persönl. Mitteilung). Es ist somit anzunehmen, dass schon nach kurzer Expressionszeit genügend K28 α -Moleküle in der Zelle vorhanden sind, die einen Zellzyklusarrest und damit als spätere Folge einen Stopp der Proteinbiosynthese induzieren, sodass die Menge an Toxinmolekülen für eine Detektion mittels IIF oder Western-Analyse nicht ausreicht. Aus diesem Grund wurde für weitere Untersuchungen auf die Deletionsmutanten $\Delta elm1$, $\Delta cse2$ und $\Delta ssn8$ zurückgegriffen, die im MBA einen resistenten Phänotyp gegenüber K28 zeigten (Reiter 2004). Die Mutanten sollten demnach auch eine intrazelluläre Expression von präpro α überleben, wodurch genügend Toxinmoleküle in den Zellen für eine erfolgreiche Detektion mittels IIF akkumulieren sollten. Da eine Integration des präpro α -kodierenden, integrativen Plasmids in das Genom der Mutanten erfolglos blieb, wurde das Letalkonstrukt plasmidgetrieben exprimiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der MBA-Tests zeigten die Mutanten im seriellen Verdünnungsassay einen sensitiven Phänotyp gegenüber der Expression des Letalkonstrukts präpro α . Diese Beobachtung kann mehrere Gründe haben. Die DNA-Sequenz von präpro α lag in diesem Versuch unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors im „multicopy“-Vektor pESC^{Leu} vor. Dieser liegt in einer Kopienzahl von mehr als 100 pro Zelle vor (Romanos *et al.* 1992), wodurch die Menge an exprimierten Toxinmolekülen ebenfalls sehr hoch ist. Des Weiteren sorgt auch der starke *GAL1*-Promotor für eine hohe Expressionsrate. Die sonst resistenten Zellen sind möglicherweise nicht mehr in der Lage, die starke Expression der toxischen K28 α -Untereinheit zu tolerieren. Bei Aufnahme des Toxins ist die Menge an aktiven K28 α -Untereinheiten hingegen so gering, dass die Deletionsmutanten aufgrund noch unbekannter Mechanismen nicht sensitiv auf das Toxin reagieren. Ebenfalls denkbar ist, dass durch die Deletion von $\Delta elm1$, $\Delta cse2$ oder $\Delta ssn8$ zelluläre Prozesse gestört sind, die beispielsweise die Endozytose oder den retrograden Transport betreffen und K28 somit erst gar nicht bis in das Zytosol transportiert werden kann. Bei intrazellulärer Expression von präpro α spielen diese zellulären Prozesse hingegen keine Rolle, weswegen infolgedessen eine toxische Wirkung auftreten kann. Diese Vermutung trifft am ehesten auf $\Delta elm1$ zu, da beschrieben ist, dass die Deletion eine Veränderung der Zellmorphologie und somit eventuell auch eine veränderte Zellwandstruktur bewirkt (Moriya

& Isono 1999). Bei *CSE2* und *SSN8* handelt es sich um Bestandteile des RNAPII-Holoenzym bzw. des Mediator Komplexes (Gustafsson *et al.* 1998, Liao *et al.* 1995, Reeves & Hahn 2003). Eine durch deren Deletion verursachte Änderung, beispielsweise in der Endozytose bzw. im retrograden Transport, ist hingegen nicht beschrieben. Obwohl die Mutanten sensitiv gegenüber der Expression von präpro α reagierten, wurden sie zur Detektion von K28 α mittels IIF eingesetzt. Es konnten jedoch auch in diesem Fall keine Signale des Toxins beobachtet werden.

Insgesamt konnte trotz vielfältiger Bemühungen die Bestimmung der Lokalisation von K28 bzw. K28 α mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden. Als Hauptproblem erwiesen sich hierbei die verwendeten K28- bzw. K28 α -Antikörper, die starke Kreuzreaktionen hervorriefen, wodurch mögliche Signale des Toxins überlagert wurden. Weiterhin ist nicht klar, ob die Methode eine ausreichende Sensitivität zum Nachweis von K28 α besitzt. Da vermutlich nur wenige K28 α -Moleküle bis in den Zellkern gelangen, ist nicht sicher, ob diese Anzahl für ein Signal im Fluoreszenzmikroskop ausreicht, sodass eine eindeutige nukleäre Lokalisation von K28 α nicht nachgewiesen werden konnte.

Mit der Immunogold-Elektronenmikroskopie (IEM) fand eine weitere mikroskopische Technik zur direkten Bestimmung der Lokalisation von K28 α Anwendung. Durch die dabei erreichbare, extrem hohe Auflösung ist es möglich, die subzelluläre Ultrastruktur von Hefezellen sehr detailreich zu analysieren, sodass auch einzelne Organellen sehr gut voneinander zu unterscheiden sind. Zusätzlich bietet sich die Möglichkeit, die zur TEM präparierten Ultradünnschnitte mit Gold-markierten Antikörpern zu behandeln. Die Goldpartikel erscheinen in der TEM-Aufnahme als schwarze Punkte, sodass eine exakte Bestimmung der Lokalisation eines Proteins innerhalb einer Zelle möglich ist. Da die Anfertigung der Ultradünnschnitte von Hefezellen mittels Kryosektion viel Erfahrung voraussetzt, wurden die IEM-Untersuchungen am „University Medical Centre Utrecht“ in der Arbeitsgruppe von Fulvio Reggiori durchgeführt.

Als Grundvoraussetzung zur IEM gilt die Verwendung äußerst spezifischer, primärer Antikörper, da schon kleinste Kreuzreaktionen zu falschen Ergebnissen führen können. Da im Rahmen der Arbeit kein K28- bzw. K28 α -Antikörper zur Verfügung stand, der diese Bedingung erfüllte, wurden „getaggte“ Toxinvarianten hergestellt. Das V5-„Tag“ geht auf eine Peptidsequenz des Simian Virus SV5 zurück, für die sehr spezifische Antikörper zur Verfügung stehen, wodurch sich eine Anwendung zum Epitop-„Tagging“ anbietet. V5-„getaggte“ Proteine konnten bereits erfolgreich mittels IEM nachgewiesen werden (Reggiori, pers. Mitteilung). Die Expression einer toxisch aktiven K28-Variante, bei der an das N-terminale Ende von K28 α ein V5-„Tag“ angefügt wurde, blieb erfolglos. Reiter (2004)

konnte zeigen, dass K28-Varianten, die N- bzw. C-terminal der K28 α -Untereinheit ein c-myc bzw. HA-„Tag“ enthielten, ebenfalls keine biologische Aktivität besaßen. Zwar wurden die Varianten teilweise sezerniert, führten jedoch zu keinem Absterben K28-sensitiver Zellen (Reiter 2004). Bisher ist es somit insgesamt nicht gelungen, biologisch aktives K28-Toxin mit „getaggtter“ α -Untereinheit herzustellen. Eine Bestimmung der Lokalisation von K28 α in Toxin-behandelten Zellen mittels IEM war daher nicht möglich. Aus diesem Grund wurde auf Zellen zurückgegriffen, die intrazellulär ein V5-„getaggttes“ K28 α -Letalkonstrukt exprimierten. Die K28 α -Variante ppV5 α zeigte bei Expression von einem „multicopy“-Plasmid im seriellen Verdünnungstest einen leichten toxischen Effekt (Kelkel 2009); die Expression von ppV5 α von dem Zentromervektor pRS316 wies im seriellen Verdünnungstest auf einen Verlust der Toxizität hin. Es zeigte sich damit erneut, dass das Anfügen eines „V5-Tags“ an K28 α in den allermeisten Fällen zu einem Toxizitätsverlust von K28 α führt.

Für eine statistische Auswertung der mittels IEM erhaltenen Daten war es notwendig, dass die Expressionsstärke des zu untersuchenden Proteins in allen Zellen gleich ist. Die ppV5 α -Sequenz wurde daher in den Zentromervektor pRS316 inkloniert, sodass pro Zelle etwa 1-2 Genkopien von ppV5 α vorlagen. Die Integration des Konstrukts in das Genom der Hefe wurde nicht durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Versuche ebenfalls mit Zellen durchgeführt, bei denen ppV5 α auf einem „multicopy“-Plasmid kodiert war. In Western-Analysen wurde eine zur IEM ausreichende Expression von ppV5 α in beiden Fällen bestätigt. Ein Nachweis von K28 α im Hefenukklus konnte dennoch nicht erbracht werden. Signale der Goldpartikel waren nur in einem Bruchteil der Zellen erkennbar, womit eine statistische Auswertung der Daten nicht möglich war. Die Goldpartikel lokalisierten dabei zum größten Teil im Bereich der Kernmembran. Vereinzelt waren Signale im Golgi-Apparat zu erkennen. Die Frage, warum nur wenige Zellen Signale von ppV5 α zeigten, kann abschließend nicht eindeutig geklärt werden. Bei der IEM von Hefezellen werden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von unter 100 nm angefertigt (Griffith *et al.* 2008). Der intrazelluläre Bereich, der im TEM betrachtet wird, entspricht daher weniger als einem Prozent des Gesamtzellvolumens. Damit sind auch weniger als ein Prozent der ursprünglich in der Zelle vorhandenen Epitope für eine Antikörperfärbung verfügbar. Für einen erfolgreichen Nachweis eines Proteins mittels IEM ist daher eine ausreichende Menge des Proteins Voraussetzung. Das Konstrukt ppV5 α lag in einem „multicopy“- und in einem Zentromervektor vor. Da in beiden Fällen die Expression durch den starken Promotor P_{GAL1} induziert wurde und ppV5 α in Western-Analysen detektiert werden konnte, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass das Ausbleiben von Signalen in der IEM auf eine zu geringe Proteinmenge zurückzuführen ist. Vielmehr scheint, dass insgesamt nur wenige Zellen überhaupt das Konstrukt ppV5 α exprimierten.

Neben dem Nachweis von K28 α im Hefenukleus sollte mit Hilfe der IEM auch die intrazelluläre Lokalisation des Volllängentoxins K28 untersucht werden. Da auch in diesem Fall kein ausreichend spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, wurde an das β -C-terminale Ende des Wildtyptoxins ein V5-„Tag“ angefügt. Interessanterweise zeigte die K28V5-Variante, bei der das V5-„Tag“ C-terminal des HDEL β -Motivs angefügt wurde, eine größere biologische Aktivität. Die HDEL-Sequenz ist für die Bindung des Toxins an den Sekundärrezeptor Erd2p und den retrograden Transport verantwortlich (Gießelmann 2007). Die Daten deuten an, dass dabei die Erkennungssequenz HDEL nicht unmittelbar am C-terminalen Ende vorhanden sein muss, sondern dass das Motiv auch noch durch Erd2p gebunden wird, wenn eine weitere Peptidsequenz folgt. Die gleichen Beobachtungen wurden bereits mit einem Strep- und einen FLAG-„Tag“ gemacht (Cappel 2006, Guida 2007). In Western-Analysen konnte K28 β ^{HDEL β -V5} in Rohextrakten von Toxin-behandelten Zellen detektiert werden. Die aufgenommene Toxinmenge sollte demnach zum Nachweis mittels IEM ausreichend sein. Dennoch waren keine Signale des Toxins im TEM beobachtbar. Aufgrund des bereits beschriebenen Verlustes des Großteils an Epitopen bei Anfertigung der Ultradünnschnitte kann das Ausbleiben der Signale auf eine zu geringe intrazelluläre Toxinmenge zurückgeführt werden. Das gleiche Problem stellte sich bereits bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (s.o.).

Insgesamt war es nicht möglich, mit Hilfe der IEM eine intrazelluläre Bestimmung der Lokalisation von K28 bzw. der toxischen K28 α -Untereinheit durchzuführen. Im Falle des Volllängentoxins konnten keine Signale von aufgenommenen Toxinmolekülen detektiert werden. Bei intrazellulärer Expression einer K28 α -Variante war es aufgrund der äußerst geringen und ungleichmäßigen Expression nicht möglich, die IEM-Aufnahmen sicher auszuwerten. Dennoch ist es sinnvoll für zukünftige Versuche die IEM als Nachweismethode in Betracht zu ziehen. In zahlreichen Publikationen hat sich diese Technik zur Bestimmung der Lokalisation eines Proteins und zur Aufklärung zellulärer Prozesse bewährt (Mari *et al.* 2010, Griffith & Reggiori 2009, Blevé *et al.* 2005, Fahrenkrog *et al.* 1998). Als Voraussetzung dafür müsste ein Antikörper zur Verfügung stehen, der effizient und spezifisch, ohne das Auftreten von Kreuzreaktionen, K28 α erkennt. Weiterhin müsste die Toxinaufnahme der zu untersuchenden Zellen optimiert werden, um eine gleichmäßige und ausreichende intrazelluläre Toxinmenge zu gewährleisten.

Im Rahmen der dritten mikroskopischen Technik, die zur Aufklärung der Lokalisation von K28 α zum Einsatz kam, wurden Fusionsproteine bestehend aus K28 α und dem rot fluoreszierenden Protein mRFP in sensitiven Hefezellen exprimiert. Bei einem Kernimport von K28 α sollten mRFP-Signale im Hefenukleus detektierbar sein. Der große Vorteil dieser Technik beruht darauf, dass, anders als bei IIF und IEM, lebende Zellen *in vivo* untersucht

werden können. Eventuell auftretende Artefakte, die durch die Präparation der Zellen verursacht werden, können somit vermieden werden.

Die beschriebene Methode fand bereits Anwendung zur Verifizierung der nukleären Lokalisation des *E. coli* Toxins CdtB in Säugerzellen. So konnte eine Fusion aus CdtB und eGFP nach Expression in Cos-7 Zellen fluoreszenzmikroskopisch eindeutig im Zellkern detektiert werden. Interessanterweise beruht die letale Wirkung dieses Toxins ebenfalls auf einem Zellzyklusarrest bzw. durch Auslösen der Apoptose-Kaskade (McSweeney & Dreyfus 2004). K28 α ist demnach das zweite Proteintoxin und das erste Killertoxin, für das eine terminale, nukleäre Lokalisation beschrieben wurde.

Verschiedene K28 α -mRFP-Fusionen sollten die terminale Lokalisation von K28 α im Fluoreszenzmikroskop darstellen. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass K28 α bei intrazellulärer Expression nur dann toxisch wirkt, wenn es in das ER importiert wurde (Sendzik 2006, Kelkel 2009). Um daher eine biologische Aktivität, die eine korrekte Lokalisierung erfordert, zu gewährleisten, wurden Konstrukte mit K28-eigener Signalsequenz erstellt. Nach ER-Import wird K28 α vermutlich bis in den Golgi-Apparat weitertransportiert, um von dort retrograd wieder in das ER zu gelangen, von wo aus es in das Zytosol retrotransloziert (Kelkel 2009). K28 α trägt an seinem C-terminalen Ende eine Kex2p-Erkennungssequenz, wodurch ein K28 α -mRFP-Fusionsprotein im Golgi-Apparat durch Kex2p gespalten würde. Aus diesem Grund wurde die Kex2p-Erkennungssequenz IQSR zu IQSA mutiert (Riffer *et al.* 2002). Zur Kontrolle wurde das gleiche Konstrukt in unmutierter Form untersucht, sowie K28 α -mRFP-Varianten ohne ER-Signalsequenz, die entweder zytosolisch exprimiert oder durch N-terminale NLS-Sequenz forciert in den Kern importiert werden sollten. Es zeigte sich in seriellen Verdünnungstests, dass mit Ausnahme des Konstrukts prä α mRFP alle anderen K28 α -mRFP-Varianten ihre Toxizität verloren. Dieser Umstand machte eine Interpretation der sich anschließenden Fluoreszenzaufnahmen schwierig, da das Ausbleiben der Toxizität möglicherweise auf eine Fehllokalisierung der Fusionsproteine zurückgeführt werden kann. Eine genaue Bestimmung der terminalen Lokalisation von K28 α setzt die biologische Aktivität der toxischen Untereinheit voraus. Es ist denkbar, dass durch die Fusion von mRFP an K28 α ein Kernimport – unabhängig davon ob passiv oder forciert – nicht mehr möglich war, wodurch das Toxin nicht wirken konnte. Das Konstrukt prä α mRFP zeigte hingegen eine toxische Wirkung. Da bei dieser Kontrolle die Kex2p-Schnittstelle nicht mutiert und somit funktionell war, ist denkbar, dass im Golgi-Apparat mRFP von K28 α abgespalten wurde, wodurch dieses wieder in das Zytosol und letztendlich in den Nukleus gelangen konnte. Diese Daten untermauern die von Kelkel (2009) postulierte Hypothese, dass K28 α nach ER-Import bis in den Golgi-Apparat transportiert wird. Die K28 α -mRFP-Variante mit mutierter Kex2p-Erkennungssequenz wird möglicherweise ebenfalls bis in den Golgi-Apparat transportiert. Da allerdings mRFP nicht

von K28 α abgespalten wird, ist ein Rücktransport von K28 α in das Zytosol nicht möglich, wodurch eine toxische Wirkung nicht auftreten konnte.

Die Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte unerwartete und ungewöhnliche Verteilungen der K28 α -mRFP-Varianten. In Zellen, die die zytosolische Variante α mRFP bzw. die Fusion NLS α mRFP exprimierten, waren die Fluoreszenzsignale in der Kernmembran und im peripheren ER erkennbar. Die Aufnahmen deuteten eine ER-Lokalisation dieser K28 α -mRFP-Varianten an, was insofern nicht zu erwarten war, da diese Konstrukte keine für einen ER-Import obligatorische Signalsequenz enthielten. Ein Proteinimport in das ER ohne entsprechende Signalsequenz ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und widerspricht den aktuellen Annahmen bezüglich des Protein-„Targetings“ in eukaryotischen Zellen. Eine mögliche Erklärung für die Fluoreszenzsignale im ER ist darauf zurückzuführen, dass die K28 α -mRFP-Varianten auf zytosolischer Seite mit einem ER-Membranprotein interagierten. Die Fluoreszenzsignale würden demnach nur in der ER-Membran auftreten, was aufgrund der geringen Größe von Hefezellen in einem einfachen Fluoreszenzmikroskop nicht vom ER-Lumen zu unterscheiden ist. Ein mögliches Protein, das dafür in Frage kam, stellt die Ubiquitin-Ligase Doa10p dar. Diese ist in der ER-Membran inseriert und für den Abbau fehlgefalteter Proteine über den ERAD-Pathway verantwortlich (Swanson *et al.* 2001). Zellen, die eine GFP-„getaggte“ Doa10p-Variante exprimieren, zeigen dabei eine den K28 α -mRFP-Varianten ähnliche Verteilung der Fluoreszenzsignale (Deng & Hochstrasser 2006). Klassischerweise ist die ERAD-Maschinerie für den Abbau fehlgefalteter Proteine im ER verantwortlich, jedoch konnte ebenso eine Beteiligung beim Abbau zytosolischer Proteine gezeigt werden (Metzger *et al.* 2008). Es war daher vorstellbar, dass α mRFP und NLS α mRFP aufgrund einer Fehlfaltung an Doa10p binden und hierdurch zu Fluoreszenzsignalen an der ER-Membran führen. Aus diesem Grund wurden die beiden K28 α -mRFP-Varianten in der Deletionsmutante Δ doa10 exprimiert und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Es zeigten sich die gleichen Verteilungen der Fluoreszenzsignale wie bei den Wildtypzellen. Das Auftreten der Fluoreszenzsignale an der ER-Membran kann somit nicht auf eine Interaktion mit Doa10p zurückgeführt werden. Eine weitere mögliche Erklärung kann durch die physikalischen Eigenschaften von K28 α gegeben werden. Aufgrund der hohen Anzahl hydrophober Aminosäuren besitzt die K28 α -Untereinheit eine gewisse intrinsische Affinität zu biologischen Membranen. Es ist vorstellbar, dass aufgrund dessen die K28 α -mRFP-Varianten an die ER-Membran binden oder möglicherweise sogar in diese inserieren. Für das Pflanzentoxin RTA ist dies bereits beschrieben. Eine durch Temperaturerhöhung induzierte Konformationsänderung ermöglicht es RTA, in die ER-Membran zu inserieren (Mayerhofer *et al.* 2009). Es ist denkbar, dass durch Fusion an mRFP die Struktur von K28 α derart verändert wurde, dass mehr hydrophobe Aminosäurereste nach außen positioniert wurden, wodurch eine Bindung an die

ER-Membran möglich wird. Letztendlich zeigten die Fluoreszenzaufnahmen, dass die zytosolisch und nukleär exprimierten K28 α -mRFP-Fusionen eindeutig fehllokalisiert in der Zelle vorliegen. Beide Varianten zeigten weiterhin keinen toxischen Effekt, der zumindest im Falle des Konstrukts NLS α mRFP aufgrund des forcierten Kernimports erwartet wurde, sodass diese Konstrukte nicht zur Aufklärung der Lokalisation von K28 α beitragen konnten. Bei dem Konstrukt prä α mRFP handelte es sich um eine Kontrolle, bei der K28 α von mRFP im Golgi-Apparat durch Kex2p getrennt wurde. Die toxische α -Untereinheit wurde aus dem Sekretionsweg transloziert und konnte den Zellzyklus arretieren. Die beobachtete letale Wirkung stimmt somit mit dem Modell überein, nach dem K28 α nach ER-Import bis zum Golgi-Apparat transportiert wird und auf noch unbekannte Weise aus dem Sekretionsweg wieder austritt (Kelkel 2009). Erstaunlicherweise zeigten Zellen, die die K28 α -mRFP-Variante mit mutierter Kex2p-Schnittstelle exprimierten, keine Fluoreszenzsignale. Selbst bei Sekretion von α^{R149A} mRFP, die bei diesem Konstrukt nicht ausgeschlossen werden kann (Riffer *et al.* 2002), müssten die Zellen Fluoreszenzsignale zeigen (Eiden-Plach *et al.* 2004). Ob die Fusionsvariante überhaupt exprimiert wurde, konnte nicht festgestellt werden, da keine der K28 α -mRFP-Varianten mittels Western-Analyse nachweisbar war. Eine zufriedenstellende Erklärung für das Ausbleiben der Fluoreszenzsignale von prä α^{R149A} mRFP kann mit den vorhandenen Kenntnissen nicht erbracht werden. Einer abschließenden Klärung der Frage, aus welchen Gründen die K28 α -mRFP-Fusionen fehllokalisierten oder keine Signale zeigten, wurde in dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen, da der Fokus primär auf der Aufklärung der terminalen Lokalisation von K28 α lag.

Forcierter Kernimport und -export von K28 α

Mit Hilfe mikroskopischer Techniken war es nicht möglich, die nukleäre Lokalisation von K28 α direkt nachzuweisen. Reiter fand durch seine Untersuchungen bereits starke indirekte Hinweise für einen Kernimport von K28 α . Das Letalkonstrukt prä α konnte dabei durch das Einfügen einer Kernlokalisationssequenz zwischen prä- und K28 α -Sequenz in seiner Toxizität gesteigert werden (Reiter 2004). Die Verwendung von Kernlokalisierungssignalen bzw. -exportsignalen zur Aufklärung der Lokalisation eines Proteins ist auch bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Edgington & Futcher 2001, Vergara *et al.* 2011). Der Weg, den K28 α -Letalkonstrukte in der Zelle durchlaufen, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Bisherige Daten deuten darauf hin, dass nach ER-Import K28 α bis in den Golgi-Apparat transportiert wird und von dort retrograd über das ER wieder in das Zytosol gelangt (Kelkel 2009). Ein ER-Import wurde als für die Toxizität obligatorischen Schritt angesehen, da zytosolisch exprimierte K28 α -Varianten keine Toxizität zeigten (Sendzik 2006, Reiter

2004). Möglicherweise erfährt das Toxin im ER posttranslationale Modifikationen oder Konformationsänderungen, die erst eine toxische Wirkung erlauben. Umso erstaunlicher ist die Beobachtung, dass K28 α -Varianten, die lediglich eine NLS-Sequenz am N-Terminus besitzen, ebenfalls toxisch wirken (Sendzik 2006, Reiter 2004). Der sonst zur Toxizität notwendige ER-Import ist bei diesen Varianten entbehrlich. Ein gesteigerter Kernimport von K28 α gleicht somit eventuell nicht vorhandene posttranslationale Modifikationen aus. Die von Reiter auf Grundlage von Wachstumsanalysen gemachten Beobachtungen konnten in der vorliegenden Arbeit weitestgehend bestätigt werden. Auch bei einer Analyse mittels seriellen Verdünnungstest zeigten NLS-K28 α -Varianten eine toxische Wirkung. Das Konstrukt prä-NLS-K28 α musste neu erstellt werden und erwies sich ebenfalls im seriellen Verdünnungsassay als toxisch. Anders als bei Reiter war eine gesteigerte Toxizität durch die NLS allerdings nicht feststellbar.

Zusätzlich zu diesen Konstrukten wurde eine prä-K28 α -Variante erstellt, die zwischen prä- und K28 α -Sequenz das Kernexportsignal des Hefeproteins Kap95p enthielt. Die dabei verwendete NES-Sequenz LEGRILAALTL reicht aus, um einen Kernexport zu induzieren (Irvine & Wente, 1997). Das Vorhandensein der NES-Sequenz hob die Toxizität der K28 α -Variante auf. Ein aktiver Kernexport von K28 α schützt somit die Zellen vor dessen toxischer Wirkung. K28 α scheint somit einen Zellzyklusarrest nur dann hervorrufen zu können, wenn es nukleär lokalisiert ist.

Die Untersuchung von Kernporenmutanten lieferte weitere Hinweise für einen Kernimport von K28 α (Reiter 2004). Mehrere Mutanten mit Deletionen in Kernporenproteinen zeigten eine veränderte K28-Sensitivität. Reiter postulierte, dass bei Deletion der Nukleoporene *NUP60*, *NUP84* bzw. *GFD1* der Durchmesser der Kernpore abnimmt, wodurch weniger K28 α in den Nukleus eintritt und somit die Zellen weniger effektiv abgetötet werden. Bei Deletion von *NUP120* und *NUP170* ist die Struktur der Kernpore möglicherweise derart verändert, dass der Porendurchmesser zunimmt und mehr K28 α -Moleküle in den Zellkern gelangen können. Tatsächlich ist beschrieben, dass bei Deletion von *NUP170* der passive Kerntransport erhöht ist (Shulga *et al.* 2000). Zudem ist der Zusammenbau neuer NPCs gestört, wodurch die Gesamtzahl an NPCs vermindert ist (Makio *et al.* 2009). Nup120p und Nup84p sind Untereinheiten eines NPC-Subkomplexes und am nukleozytoplasmatischen poly(A)⁺ RNA Export beteiligt (Aitchison *et al.* 1995, Heath *et al.* 1995, Siniosoglou *et al.* 1996). Die Deletion von *NUP84* geht mit einem Defekt in der Organisation der Kernpore und in der Verteilung der NPCs in der Kernmembran einher (Siniosoglou *et al.* 1996, Siniosoglou *et al.* 2000). Eine genaue Funktion von Gfd1p ist bisher nicht bekannt, jedoch lokalisiert es an der zytoplasmatischen Seite der Kernporenkomplexe (Hodge *et al.* 1999).

Beide K28 α -Varianten (prä-NLS- α^R und prä-NES- α^R) zeigten bei Expression in den Deletionsmutanten jeweils die gleiche Toxizität wie im Wildtypstamm BY4742. Die im MBA-

Test beobachteten Unterschiede in der Sensitivität der Mutanten konnten bei intrazellulärer Expression nicht verifiziert werden.

Parallel zu den o.a. Konstrukten wurden weitere prä α -Varianten erstellt, bei denen sich NLS bzw. NES am C-terminalen Ende von K28 α befanden. Um eine proteolytische Spaltung zwischen K28 α und NLS/NES zu verhindern, wurde auch in diesen Konstrukten die Kex2p-Erkennungssequenz IQSR zu IQSA mutiert. Im seriellen Verdünnungstest zeigten alle Konstrukte (prä α , prä α ^{R149A}NLS und prä α ^{R149A}NES) sowohl im Wildtypstamm BY4742, als auch in den Kernporenmutanten $\Delta nup60$, $\Delta nup84$, $\Delta nup120$, $\Delta nup170$ und $\Delta gfd1$ die gleiche Toxizität. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die verwendeten NLS- und NES-Sequenzen bei C-terminaler Fusion an K28 α nicht mehr funktionell waren.

Mechanismus des Kernimports von K28 α

Da ein Kernimport von K28 α aller Wahrscheinlichkeit nach für eine toxische Wirkung essentiell ist, stellt sich als Folge die Frage, wie K28 α in den Kern gelangt. Prinzipiell kann das Toxin über verschiedene Mechanismen in den Nukleus importiert werden. Eine passive Diffusion kann aufgrund des geringen Molekulargewichts von K28 α (10 kDa) als wahrscheinlichste Variante betrachtet werden. Viele kleine, zelleigene Proteine werden auf diese Weise in den Zellkern transportiert. Für eine MAP-Kinase aus *Xenopus* beispielsweise konnte ein passiver Kernimport bereits eindeutig nachgewiesen werden (Adachi *et al.* 1999). Es ist davon auszugehen, dass die Mehrzahl an kleinen Proteinen passiv in den Kern diffundieren kann. Viele werden jedoch auch über aktive Transportmechanismen importiert (Breeuwer & Goldfarb 1990, Pruschy *et al.* 1994). Es ist daher nicht gänzlich auszuschließen, dass auch K28 α aktiv in den Nukleus gelangt. Zwar ist in der Aminosäuresequenz keine bekannte, klassische NLS vorhanden (Reiter 2004), jedoch gibt es eine große Diversität unter den nicht-klassischen NLS-Sequenzen, sodass eine genaue Vorhersage, ob eine bestimmte Sequenz ein Kernlokalisierungssignal darstellt, nicht immer einfach ist (Sorokin *et al.* 2007, Görlich & Kutay 1999). Mutanten, bei denen einzelne, nicht-essentielle Importine deletiert waren, zeigten im Vergleich zum Wildtypstamm keine Änderungen in ihrer K28-Sensitivität (Reiter 2004). Ein aktiver Transportmechanismus kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, da unter den Karyopherinen eine funktionelle Redundanz herrscht und bei Deletion eines Transportproteins ein anderes dessen Funktion übernehmen kann. So konnte beispielsweise für den Kernimport der HO-Endonuklease die Beteiligung von vier Importinen nachgewiesen werden. Die Deletion eines dieser Importine hat keine Auswirkungen auf die nukleäre Lokalisation von HO (Bakhrat *et al.* 2006). Des Weiteren wurden nur Mutanten untersucht, bei denen jeweils ein nicht-essentielles Karyopherin deletiert war. Eine potentielle Beteiligung eines essentiellen Importins am

Kernimport von K28 α konnte somit nicht überprüft werden. Von den elf in *S. cerevisiae* bekannten Importinen sind vier essentiell.

Einen weiteren Kernimportmechanismus stellt die direkte Interaktion des zu importierenden Proteins mit dem NPC dar (Matsubayachi *et al.* 2001, Whitehurst *et al.* 2002). Anders als bei der passiven Diffusion bindet das Protein dabei an Nukleoporene und wird durch die Kernpore geleitet. Unter der Annahme, dass nur wenige K28 α -Moleküle im Zellkern für eine toxische Wirkung ausreichen, stellt dieser Mechanismus eine interessante Möglichkeit dar, da im Gegensatz zum passiven Transport K28 α -Moleküle durch die Bindung an Nukleoporene an den Kernporen konzentriert werden. Zur Überprüfung, ob K28 α auf diese Weise in den Kern gelangt, könnten einfache Interaktionsstudien (z.B. Ko-Immunopräzipitations- oder His-„Pull-down“-Assays) zwischen K28 α und einzelnen NUPs durchgeführt werden.

Eine nukleäre Lokalisation von K28 konnte durch direkte Nachweisverfahren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden. Die Versuche zum forcierten Kernimport und -export bestätigen und erweitern die bereits von Reiter (2004) beschriebenen Beobachtungen, wodurch sich die Hinweise auf eine zur toxischen Wirkung obligatorischen nukleären Lokalisation verdichten. Dennoch sind detailliertere Untersuchungen zum Kernimport von K28 α nötig. Bisher ist mit dem „Cytotolethale distending toxin“ CDT aus *E. coli* erst ein einziges A/B-Toxin bekannt, dessen toxische Untereinheit in den Zellkern importiert wird (McSweeney & Dreyfus 2004, Hontz *et al.* 2006). K28 α stellt somit das zweite bekannte A/B-Toxin und das erste Killertoxin dar, das für seine toxische Wirkung im Nukleus lokalisiert sein muss.

4.2 Mechanismus des K28-induzierten Zellzyklusarrests

Unter der Vielzahl an Killertoxinen, die bisher bekannt sind, stellt K28 mitunter das am besten charakterisierte Toxin dar. Viele zelluläre Prozesse, an denen K28 beteiligt ist, wie z.B. die Toxinsynthese und -sekretion, dessen endozytotische Aufnahme und retrograder Transport konnten sehr detailliert auf molekularer Ebene aufgeklärt werden (Schmitt & Breinig 2002, Schmitt & Breinig 2006, Carrol *et al.* 2009). Die molekularen Grundlagen des K28-induzierten Zellzyklusarrests sind hingegen bisher nur unzureichend beschrieben.

K28-sensitive Hefen arretieren ihren Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase mit einer mittelgroßen Knospe ohne eingewanderten Zellkern und ohne ausgebildeten Spindelapparat. Die DNA-Synthese ist irreversibel gehemmt, wodurch die Zellen einen präreplikativen DNA-Gehalt von 1n besitzen (Schmitt *et al.* 1996). Da Zellen, bei denen die

Replikation gestört ist, gewöhnlich keine Knospe ausbilden, wird vermutet, dass K28 die Zellzyklusmaschinerie an verschiedenen Punkten angreift und somit einen pleiotropen Wirkmechanismus aufweist. Unterstützt wird diese Annahme durch Daten aus Y2H-Analysen, bei denen u.a. das TATA-Box-Bindeprotein TBP und Apc2p, eine Untereinheit des APC als potentielle Interaktionspartner identifiziert wurden (Reiter 2004). Biochemisch konnten die Interaktionen zwischen K28 α und Apc2p bzw. Spt15p (TBP) *in vitro* verifiziert werden (Meidlinger 2001, Reiter 2004). Mit Ctr9p und Zds1p wurden mittels Y2H-Analyse weiterhin potentielle Interaktionspartner von K28 α identifiziert, die an der transkriptionellen Regulation der Expression der G1/S-Zykline beteiligt sind (Yu *et al.* 1996, Walker *et al.* 1997, Koch *et al.* 1999). Einen Einfluss von K28 auf die Expression der G1/S-Zykline konnte in Northern-Analysen bestätigt werden. Toxin-behandelte Zellen zeigten dabei eine Abnahme der *CLN1*- und *CLN2*-mRNA (Reiter 2004). Bei einer Überexpression der G1/S-Zykline konnte im Falle von *CLN2* die toxische Wirkung von K28 vollständig aufgehoben werden. *CLN1*-überexprimierende Zellen wiesen hingegen einen Arrest in der G2-Phase auf (Reiter 2004). Aufbauend auf den bisherigen Daten wurde im Kontext der vorliegenden Arbeit der K28-induzierte Zellzyklusarrest auf molekularer Ebene näher untersucht.

K28 α interagiert *in vivo* mit Proteinen der Transkriptionsmaschinerie und der Zellzyklusregulation

Mit Apc2p und Spt15p (TBP) wurden *in vitro* zwei Interaktionspartner von K28 α biochemisch identifiziert bzw. die genetischen Interaktionen, die mittels Y2H charakterisiert wurden, verifiziert. Bei den Untersuchungen wurden sowohl das Fängerprotein K28 α , als auch die Beuteproteine Apc2p und Spt15p in *E. coli* exprimiert und mittels GST-„Pulldown“-Assays die Interaktionen nachgewiesen (Meidlinger 2001, Reiter 2004). Die Interaktionen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zusätzlich in lebenden Hefezellen mittels der bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsanalyse (BiFC) nachgewiesen werden. Dieses System wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Identifikation von Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden Zellen eingesetzt (Bracha-Drori *et al.* 2004, Cabantous *et al.* 2005, Schäuble 2008). Das System basiert auf der funktionellen Rekonstitution eines Fluoreszenzproteins, die nur bei einer Interaktion zwischen einem Fänger- und einem Beuteprotein auftreten kann (Hu *et al.* 2002). Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Fluoreszenzprotein mCherry leitet sich von dem tetrameren rot fluoreszierenden Protein DsRed ab und zeichnet sich u.a. durch eine hohe Photostabilität und kurze Reifungsdauer aus (Shaner *et al.* 2005, Fan *et al.* 2008). Des Weiteren besitzt es im Hinblick auf das BiFC-System den Vorteil, dass seine Fluoreszenzeigenschaften bei N- und C-terminaler Fusion an ein Protein wenig beeinträchtigt sind (Shaner *et al.* 2004). Fan *et al.* setzten mCherry erstmals erfolgreich im

BiFC-System ein und konnten die Interaktion zwischen dem SV40 „large T antigen“ und p53 nachweisen (Fan *et al.* 2008). Dabei wurde mCherry zwischen den Aminosäuren 159-160 gespalten, was in den Fragmenten MN und MC resultierte. Schäuble nutzte bereits erfolgreich das „Split-mCherry“-System zur BiFC-Analyse, um *in vivo* Interaktionspartner von K28 zu identifizieren. Mehrere ER-luminale Chaperone, ERAD-Komponenten sowie die Proteasen Kex1p und Kex2p wurden dabei als K28-Interaktionspartner charakterisiert (Schäuble 2008). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das von Schäuble etablierte BiFC-System zur Verifizierung der Interaktionen zwischen K28 α und Apc2p bzw. Spt15p eingesetzt. Prinzipiell ist durch diese Methode auch eine nukleäre Lokalisation von K28 α unter der Voraussetzung nachweisbar, dass die Interaktionen zwischen K28 α und Apc2p bzw. Spt15p im Hefenuklear stattfinden. Dass das BiFC-System zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen im Zellkern verwendbar ist, wurde bereits mehrfach beschrieben (Hu *et al.* 2002, Hoff & Kück 2005, Barnard *et al.* 2007, Sung & Huh 2007).

K28 α stellte das Fängerprotein dar und war mit dem mCherry-Fragment MN über eine hydrophobe „Linkersequenz“ fusioniert (Kerppola 2006). Zusätzlich war dem Fusionskonstrukt die K28 α -eigene ER-Signalsequenz prä vorgeschaltet, um den für die biologische Aktivität von K28 α obligatorischen Transport durch das ER zu gewährleisten. In Toxizitätsanalysen stellte sich heraus, dass das Fängerkonstrukt präMnk28 α keinen toxischen Effekt auf Hefezellen ausübte. Dies war insofern von Nachteil, da somit nicht sicher war, ob K28 α korrekt gefaltet vorlag, was sich möglicherweise negativ auf eine Interaktion mit Spt15p bzw. Apc2p auswirkte. Trotz dieser Unsicherheit wurden die BiFC-Analysen durchgeführt. Die Beuteproteine Apc2p und Spt15p waren dabei an das mCherry-Fragment MC ebenfalls über eine „Linkersequenz“ fusioniert. Nach Kotransformation und Expression von Fänger- und Beuteprotein wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Tatsächlich konnten sowohl im Falle von Apc2p, als auch Spt15p Fluoreszenzsignale von mCherry beobachtet werden. Es fand somit in beiden Fällen eine Rekonstitution des Fluoreszenzproteins statt, was auf eine Interaktion zwischen K28 α und Apc2p bzw. Spt15p schließen lässt. Die *in vitro* gewonnenen Daten von Reiter (2004) konnten somit *in vivo* bestätigt werden. Interessanterweise konnten keine Fluoreszenzsignale im Nukleus beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit den o.a. Ergebnissen, wonach eine Fusion aus K28 α und mRFP ebenfalls nicht im Nukleus detektiert werden konnte. Möglicherweise findet auch in diesem Fall kein passiver Kernimport von K28 α -MN statt, sodass die Interaktionen nur im Zytosol stattfinden konnten. Zusätzlich liefert diese Erklärung einen Hinweis auf das Ausbleiben der Toxizität des Fängerkonstrukts. Da die K28 α -MN-Fusion nicht in den Zellkern gelangte, konnte kein toxischer Effekt auf den Zellzyklus ausgeübt werden. Die Beobachtungen untermauern somit ebenfalls die Vermutung, dass der Kernimport von K28 α obligatorisch für dessen Toxizität ist.

Der Zusammenhang zwischen der Interaktion von K28 α mit Apc2p und Spt15p und dem Wirkmechanismus von K28 α ist indes nicht endgültig geklärt. Die Rolle von Spt15p bei der K28-induzierten Hemmung der Transkription wird im weiteren Verlauf der Diskussion näher erläutert. Im Falle von Apc2p konnte Reiter (2004) bereits eindeutig nachweisen, dass durch K28 der APC gehemmt wird und APC-Substrate stabilisiert werden. Unklar ist dabei der Zusammenhang zwischen der Inhibierung des APC und dem Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase. Da die Hauptfunktionen des APC während der Mitose ablaufen (Barford 2011) wurde ein pleiotroper Wirkmechanismus von K28 vorgeschlagen, bei dem neben der Hemmung des Zellzyklus an der G1/S-Transition auch die Progression durch die Mitose gestört wird. Deutlich wird dies durch die Überexpression des G1/S-Zyklins Cln1p. Zellen sind dabei in der Lage, trotz K28-Einwirkung durch die S-Phase durchzutreten. Allerdings tritt im Anschluss ein Arrest in der Mitose auf, der sehr wahrscheinlich auf die Hemmung des APC zurückzuführen ist (Reiter 2004). Das Orf-Virus, ein Mitglied der Pockenviren, exprimiert das Protein PACR („poxviral anaphase promoting complex regulator“), das ebenfalls durch Interaktion mit humanem APC2 eine Hemmung des APC induziert. Dabei wird PACR anstelle von APC11 in den APC eingebaut, wodurch dessen Ubiquitinligase-Aktivität inhibiert wird (Mo *et al.* 2009, Mo *et al.* 2010). Auch andere Viren verfolgen mittels unterschiedlicher Mechanismen die Strategie, durch Hemmung des APC die Virusreplikation zu begünstigen (Mo *et al.* 2012). Es wäre interessant, der Frage nachzugehen, ob K28 α einen ähnlichen Mechanismus wie PACR zur Hemmung des APC nutzt.

Da die eben beschriebenen Daten deutlich machen, dass das BiFC-System zur Identifizierung von Interaktionspartnern von K28 α geeignet ist, wurde in der Diplomarbeit von Sebastian Thewes das System genutzt, um in einem „Screen“ weitere Interaktionspartner von K28 α zu identifizieren. Insgesamt wurden dabei 19 Proteine getestet. Es handelte sich dabei hauptsächlich um Zellzyklus-regulatorische Proteine, die von Reiter (2004) im Y2H-System als Interaktionspartner von K28 α identifiziert wurden (Ctr9p), einen K28-resistenten bzw -hypersensitiven Phänotyp aufwiesen (Elm1p, Shp1p, Ssn8p, Cse2p, Bur2p) oder aufgrund ihrer Funktion im Zellzyklusgeschehen als potentielle „Targets“ von K28 α in Frage kamen (Swi6p, Cln2p, Cln3p, Taf1p, Cdc28p, Sic1p, Clb5p, Clb6p, Pho85p, Cdc4p, Cdc34p). Bei den Beuteproteinen Bur2p und Sic1p konnten dabei tatsächlich Signale beobachtet werden (Thewes 2009). Zwar müssen aufgrund der nur schwachen Fluoreszenzsignale die Ergebnisse mittels biochemischer Methoden, wie z.B. Ko-Immunopräzipitation oder „Pull-down“-Analysen bestätigt werden, jedoch ist aufgrund der biologischen Funktionen von Bur2p und Sic1p vorstellbar, dass sie als „Target“ von K28 α infrage kommen. Bei Bur2p handelt es sich um ein Zyklin, das mit der essentiellen CDK Bur1p wichtige Funktionen bei der Transkriptionselongation erfüllt (Yao *et al.* 2000, Keogh *et al.* 2003, Chu *et al.* 2007).

Aktiviert wird der Zyklin-CDK-Komplex durch die Kinase Cak1p, die auf genetischer Ebene mit den Untereinheiten des Paf1C Paf1p und Ctr9p interagiert (Yao & Prelich 2002, Ganem *et al.* 2005). Der Paf1C stellt ein weiteres mögliches „Target“ von K28 α dar, da er an der Transkription der G1-Zykline beteiligt ist (Koch *et al.* 1999) und Ctr9p im Y2H-„Screen“ als Interaktionspartner von K28 α identifiziert wurde (Reiter 2004). Interessanterweise ist in *Abur2* Nullmutanten die Rekrutierung des Paf1-Komplexes an die RNAPII-Transkriptionsmaschinerie deutlich vermindert (Laribee *et al.* 2005), wodurch die Expression der G1-Zykline Cln1p und Cln2p beeinträchtigt ist (Koch *et al.* 1999). Phänotypisch äußert sich die Deletion von *BUR2* in einem „G1-Delay“ (White *et al.* 2009). Es ist vorstellbar, dass durch K28 α der Bur1p-Bur2p-Komplex inaktiviert wird, wodurch die durch den Paf1-Komplex vermittelte Transkription der G1-Zykline gestört ist. Dagegen spricht die Beobachtung, dass Zellen, bei denen *BUR2* deletiert ist, hypersensitiv auf K28 reagieren (Reiter 2004). Allerdings zeigen diese Mutanten auch eine Hypersensitivität gegen Zymocin (Jablonowski & Schaffrath 2002), sodass vermutet werden kann, dass bei einer *BUR2* Deletion die allgemeine Vitalität der Zellen herabgesetzt und damit die Empfindlichkeit gegenüber toxischen Substanzen erhöht ist. Bei dem zweiten mittels BiFC gefundenen Interaktionspartner Sic1p handelt es sich um einen CDK-Inhibitor (CKI), der Komplexe aus Cdc28p und den S-Zyklinen Clb5p und Clb6p in einem inaktiven Zustand hält und somit den Übergang von der G1- zur S-Phase reguliert (Schwob *et al.* 1994, Mendenhall *et al.* 1995). Der Eintritt der Zellen in die S-Phase ist nur möglich, wenn Sic1p zuvor durch den SCF-Komplex degradiert wurde (Sheaff & Roberts 1996, Nash *et al.* 2001, Sedgwick *et al.* 2006). Denkbar ist nun, dass K28 α den Abbau von Sic1p verhindert, wodurch die Zellen nicht in die S-Phase eintreten können und am G1/S-Übergang arretieren. Sogar der durch K28 induzierte terminale Phänotyp lässt sich mit diesem Modell erklären. Da die Zellen durch Hemmung der B-Typ-Zyklin-Cdc28p-Komplexe nicht in die S-Phase eintreten können, arretieren sie mit einem präreplikativen DNA-Gehalt. Andere Prozesse, die nach „Start“ durch G1- bzw. G1/S-Zykline reguliert werden, können hingegen stattfinden, da diese Zykline nicht von Sic1p gehemmt werden (Schwob *et al.* 1994). Die Knospung kann somit noch durch Cln1p und Cln2p oder durch die Zykline Pcl1p und Pcl2p im Komplex mit der CDK Pho85p initiiert werden (Espinoza *et al.* 1994, Measday *et al.* 1994, Measday *et al.* 1997, Moffat & Andrews 2004). Das Modell kann überprüft werden, indem untersucht wird, ob in K28-behandelten Zellen Sic1p akkumuliert. In ersten Versuchen dazu wurde an die *SIC1*-Sequenz im Genom der Hefen ein V5-„Tag“ fusioniert, da kein geeigneter Sic1p-Antikörper zur Verfügung stand. Zwar konnte Sic1p-V5 bislang nicht nachgewiesen werden, dennoch lohnt es sich diesen Versuchsansatz weiter zu verfolgen, um eine Aussage über eine mögliche K28-induzierte Hemmung der Sic1p-Degradation treffen zu können. Im weiteren

Verlauf der Diskussion wird noch näher auf die Funktion von Sic1p und dessen mögliche Rolle im K28-induzierten Zellzyklusarrest eingegangen.

Mutanten mit Deletionen in Genen der Transkriptionsmaschinerie zeigen eine veränderte K28-Sensitivität

Ein weiteres Ziel der Arbeit im Hinblick auf den Arrest des Zellzyklus bestand darin, Deletionsmutanten zu finden, die eine veränderte K28-Sensitivität aufweisen. Vermindert oder erhöht sensitive Mutanten können Rückschlüsse darüber geben, welche zellulären Genprodukte und somit biologischen Prozesse an der Wirkungsweise des Toxins beteiligt sind oder dieser entgegenwirken. Bei verminderter Sensitivität bzw. vollständiger Resistenz fehlt dabei ein Protein, das für den Arretierungsmechanismus von K28 wichtig bzw. essentiell ist. So sind beispielsweise Mutanten, bei denen die Zellwandbiogenese gestört ist, resistent gegen K28, da dieses nicht mehr an die Zelle binden und somit nicht mehr internalisiert werden kann (Schmitt & Radler 1988). Mutanten, bei denen der retrograde Toxintransport gestört ist, sind ebenfalls K28-resistent (Eisfeld *et al.* 2000). Im Hinblick auf den K28-induzierten Zellzyklusarrest untersuchte bereits Reiter (2004) 415 Mutanten mit Deletionen in Zellzyklus-relevanten Genen. Insgesamt verhielten sich 32 Mutanten vermindert sensitiv, wovon vier ($\Delta elm1$, $\Delta shp1$, $\Delta ssn8$ und $\Delta cse2$) vollständig resistent waren. 18 Mutanten reagierten hypersensitiv auf das Toxin. Bei den meisten der vermindert sensitiven Mutanten waren Gene deletiert, die für Kinasen und Phosphatasen kodieren und somit eine Vielzahl an zellulären Prozessen regulieren. Ebenfalls wurden mehrere vermindert sensitive Mutanten gefunden, deren deletierte Genprodukte an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Im Gegensatz dazu reagierten Mutanten mit Deletionen von Genen, die an der Zellzyklusregulation und der Transkription beteiligt sind, hypersensitiv auf K28. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden weitere Deletionsmutanten getestet, die im Hinblick auf die Wirkungsweise von K28 von Interesse waren.

Neben K28 sind die beiden Killertoxine PaT und Zymocin bekannt, die ebenfalls einen Zellzyklusarrest in sensitiven Zellen hervorrufen. Bezüglich der Wirkungsweise von Zymocin wurde zunächst ein Modell vorgeschlagen, nach dem Zymocin die RNAPII-abhängige Transkription beeinträchtigt, wodurch die Transkription G1-spezifischer Gene inhibiert ist (Jablonowski & Schaffrath 2002, Schaffrath und Meinhardt 2005). Als „Target“ von Zymocin wurde dabei der Elongator-Komplex vorgeschlagen, da die Deletion einzelner Untereinheiten zu einer Zymocin-Resistenz führt (Frohloff *et al.* 2001). Bei dem Elongator-Komplex handelt es sich um einen Elongationsfaktor, der an der RNAPII-abhängigen Transkription beteiligt ist (Otero *et al.* 1999). Die transkriptionelle Aktivierung basiert dabei auf der Funktion des Elongators als Histon-Acetyltransferase (Krogan *et al.* 2002, Versées *et al.* 2010). Es stellte

sich allerdings heraus, dass die Arretierung des Zellzyklus nicht im Zusammenhang mit der Transkriptionselongationsfunktion des Elongators steht. Vielmehr fungiert Zymocin als tRNA-Endonuklease und schneidet bestimmte tRNA-Spezies im Anticodonbereich (Lu *et al.* 2005). Die entsprechenden tRNAs werden dabei von Zymocin nur erkannt und geschnitten, wenn sie bestimmte Modifikationen enthalten. Die jeweiligen Modifikationen werden durch den Elongator katalysiert, wodurch die Zymocin-Resistenz der Elongator-Mutanten erklärt werden kann (Lu *et al.* 2005, Jablonowski & Schaffrath 2007). Weiterhin sind mehrere tRNA-Methyltransferasen an der tRNA-Modifikation beteiligt. Von diesen spielt Trm9p eine besondere Rolle, da bei Deletion eine Resistenz gegen Zymocin und auch gegen das Killertoxin PaT aus *P. acaciae*, das ebenfalls eine tRNA-Endonuklease darstellt, auftritt (Jablonowski *et al.* 2006, Klassen *et al.* 2008, Studte *et al.* 2008). Um zu untersuchen, ob K28 einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie Zymocin bzw. PaT besitzt, wurden alle verfügbaren Elongator- und *TRM* Deletionsmutanten auf K28-Sensitivität getestet. Keine der getesteten Mutanten zeigte eine Resistenz gegen K28. Vielmehr reagierten mehrere der getesteten Mutanten, darunter auch $\Delta trm9$, hypersensitiv gegen K28. Dies macht deutlich, dass sich der Wirkungsmechanismus von K28 grundlegend von dem der beiden anderen Zellzyklus-arretierenden Killertoxine Zymocin und PaT unterscheiden muss.

Neben ihrer Funktion als Anticodonnukleasen induzieren sowohl PaT als auch Zymocin DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen in den Zielzellen (Klassen *et al.* 2004, Klassen & Meinhardt 2005, Klassen *et al.* 2011). Repariert werden solche DNA-Schäden in Hefezellen u.a. entweder über homologe Rekombination mit Hilfe von Proteinen der *RAD52* Epistasisgruppe oder über das „non homologous end joining“ (NHEJ), bei dem u.a. *YKU70* und *YKU80* beteiligt sind (Milne *et al.* 1996, Symington 2002, Daley *et al.* 2005). Interessanterweise sind Mutanten, die einen Defekt in der *RAD52* Epistasisgruppe besitzen hypersensitiv und Mutanten, denen *YKU70* oder *YKU80* fehlen, teilweise resistent gegen PaT (Klassen *et al.* 2007). Um auch im Hinblick auf die DNA-Reparatur einen Vergleich zwischen den Killertoxinen PaT, Zymocin und K28 zu erzielen, wurden auch Mutanten der *RAD52* Epistasisgruppe und Mutanten des NHEJ auf K28-Sensitivität getestet. Bei den getesteten Mutanten konnte keine K28-Hypersensitivität bzw. -Resistenz festgestellt werden. Alle Mutanten zeigten im Vergleich zum Wildtyp nur eine geringfügig abweichende K28-Sensitivität. Die Ergebnisse machen auch im Hinblick auf mögliche Killertoxin-induzierte DNA-Schäden deutlich, dass K28 in seiner Wirkung klar von PaT und Zymocin abweicht. Die Frage, ob auch K28 DNA-Schäden verursacht, ist nicht endgültig geklärt, jedoch legen diese Ergebnisse nahe, dass dies nicht der Fall ist.

Eine große Gruppe an getesteten Mutanten wies Deletionen in Genen auf, deren Genprodukte an der Regulation der RNAPII-abhängigen Transkription beteiligt sind. Auf Grundlage der Daten von Reiter (2004) ist ein Einfluss von K28 auf die

Transkriptionsmaschinerie wahrscheinlich, da die Transkription der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p inhibiert ist. Möglich ist das durch die Interaktion von K28 mit dem TATA-Box Bindeprotein Spt15p und möglicherweise Ctr9p, welches als Untereinheit im Paf1-Komplex an der Regulation der G1/S-Zyklustranskription beteiligt ist (Koch *et al.* 1999, Reiter 2004). Um einen tieferen Einblick in den Einfluss von K28 auf die Transkription zu erhalten, wurden u.a. Mutanten mit Deletionen in den „Chromatin-Remodeling“-Komplexen SAGA, SWI/SNF und RSC, dem Adapterproteinkomplex Mediator sowie den Elongationsfaktoren THO/TREX und Paf1 untersucht. Die genannten „Chromatin-Remodeling“-Komplexe spielen als Koaktivatoren eine große Rolle bei der Initiation der Transkription von regulierten Genen und somit auch bei der Expression vieler Zellzyklusregulatoren (Cairns *et al.* 1996, Cao *et al.* 1997, Du *et al.* 1998, Cosma *et al.* 1999, Cosma *et al.* 2001). Erst durch ihre Aktivität ist es der basalen Transkriptionsmaschinerie möglich an Promotorsequenzen zu binden. Zur Initiation der Transkription ist es zunächst nötig, die in Nukleosomen verpackte DNA für generelle Transkriptionsfaktoren zugänglich zu machen. Bewerkstelligt wird dies durch die HAT-Aktivität (Histon-Acetyltransferase) der „Chromatin-Remodeling“-Komplexe, die durch Acetylierung der Histone deren Affinität zur DNA herabsetzt, wodurch die Nukleosomenstruktur aufgelockert wird. Nach Bindung weiterer genereller Transkriptionsfaktoren und Adapterproteine kann dann die RNAPII zur Bildung des Präinitiationskomplexes an die DNA rekrutiert werden, wodurch der Start der Transkription eingeleitet wird. Im Falle des *HO*-Gens der Hefe konnte bestimmt werden, in welcher Abfolge die Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren an die DNA rekrutiert werden. Interessanterweise unterliegt die Transkription der G1/S-Zykline Cln1p, Cln2p sowie der Zykline Pcl1p und Pcl2p ebenfalls diesem Mechanismus (Cosma *et al.* 1999, Cosma *et al.* 2001). Dies macht erneut deutlich, dass ein Eingreifen von K28 in die Transkription durchaus mit einem Zellzyklusarrest einhergehen kann. Es zeigte sich, dass die Transkription von *HO* und der G1/S-Zykline durch zwei Wellen an Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet ist. Die erste Welle findet in G1 statt, wenn Cdc28p noch in einem inaktiven Zustand steht. Der Transkriptionsfaktor Swi5p wird in den Nucleus importiert, wo er den ersten „Chromatin-Remodeling“-Komplex SWI/SNF an die entsprechenden Promotoren rekrutiert. Als nächstes bindet der SAGA-Komplex, der die Bindung des Transkriptionsfaktors SBF ermöglicht. Auf diesen wird im weiteren Verlauf der Arbeit noch weiter eingegangen, da er eine essentielle Rolle bei der Regulation der G1/S-Transition spielt und daher ein mögliches „Target“ von K28 darstellt. Die anschließende SBF-abhängige Rekrutierung des Mediator-Komplexes Srb/Med ist umstritten (Bhoite *et al.* 2001, Cosma *et al.* 2001, Li *et al.* 2005). In der zweiten „Rekrutierungswelle“, die erst bei Cdc28p-Aktivität eingeleitet wird, binden schließlich RNAPII sowie weitere generelle Transkriptionsfaktoren, wodurch die Transkription von *HO* und der G1/S-Zykline gestartet wird (Cosma *et al.* 1999, Cosma *et al.* 2001). Die Bildung des

Präinitiationskomplexes stellt somit auch in Bezug auf den Zellzyklus die höchste Regulationsebene dar. Die an diesem Prozess beteiligten Proteine sind daher potentielle Angriffspunkte von K28.

Bei der Überprüfung der Deletionsmutanten zeigte sich im Falle der „Chromatin-Remodeling“-Komplexe SAGA, SWI/SNF und RSC in allen Fällen ein ähnliches Bild. Bei keinem der Komplexe führte die Deletion einer Untereinheit zu einer Resistenz gegen K28. Vielmehr reagierten mehrere Mutanten hypersensitiv. Im Falle des SAGA-Komplexes zeigten beispielsweise sechs der 13 getesteten Untereinheiten eine K28-Hypersensitivität.

Da keine resistente Mutante gefunden wurde, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, dass eine der getesteten Untereinheiten ein „Target“ von K28 darstellt. Die erhöhten K28-Sensitivitäten können auf eine erniedrigte Vitalität der Zellen zurückgeführt werden, die durch die jeweiligen Deletionen hervorgerufen wurde. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass Zellen mit Mutationen im SAGA-, SWI/SNF- und Mediator-Komplex auch hypersensitiv auf das Killertoxin Zymocin reagieren (Kitamoto *et al.* 2002).

Interessante Ergebnisse lieferte die Überprüfung von Mutanten des Mediator-Komplexes. Dieser besteht aus 24 Untereinheiten und ist an der Transkription nahezu aller regulierter Gene und an der basalen Transkription beteiligt (Reeves & Hahn 2003, Björklund & Gustafsson 2005, Kornberg 2005, Takagi & Kornberg 2005). Der aus 21 Untereinheiten bestehende „Core“-Mediator setzt sich je nach Autor aus den drei Modulen „head“, „middle“ und „tail“ zusammen. Die Bindung des Srb8-11-Komplexes an das „middle“-Modul ergibt den Mediator-Holokomplex (Dotson *et al.* 2000, Li *et al.* 2005). Das „head“-Modul interagiert u.a. mit der C-terminalen Domäne (CTD) von RNAPII und mit TBP (Lee & Kim 1998). Neuere Daten zeigen, dass das „head“-Modul auch mit Rpb4p, einer Untereinheit von RNAPII, interagiert (Cai *et al.* 2010, Imasaki *et al.* 2011), welche bei Deletion eine K28-Resistenz zur Folge hat (s.u.). Mit Ausnahme von Srb2p und Srb5p sind alle UE des „head“-Moduls essentiell. Die Deletion dieser Untereinheiten führte in den Mutanten zu einer erhöhten K28-Sensitivität. Unter den insgesamt 15 getesteten Mediator-Mutanten wurden sechs hypersensitive Mutanten gefunden. Erstaunlicherweise fanden sich auch vier Mutanten ($\Delta cse2$, $\Delta ssn8$, $\Delta ssn2$ und $\Delta sin4$), die resistent gegenüber K28 reagierten. Die Deletion der Mediator-Untereinheit *CSE2* führt dabei ähnlich der oben beschriebenen *BUR2*-Deletion zu einer Verzögerung in der G1-Phase (White *et al.* 2009) und stellt somit als einzige der beschriebenen Mediator-Untereinheiten einen Zusammenhang zum Zellzyklus her. Daneben ist *CSE2* auch an der Trennung der Schwesterchromatiden beteiligt (Xiao *et al.* 1993). Im Hinblick auf den K28-induzierten Zellzyklusarrest kann keine eindeutige Deutung dieser Ergebnisse erbracht werden. Ein Grund dafür ist darauf zurückzuführen, dass die genauen molekularen Funktionen der einzelnen Mediator-Untereinheiten nicht bekannt und beschrieben sind. Allen getesteten Mediator-Proteinen ist lediglich eine Funktion bei der

Regulation der RNAPII-abhängigen Transkription zugeschrieben. Die Daten stammen weitgehend mit den von Carroll *et al.* (2009) gemachten Beobachtungen überein. Die Deletion einer Untereinheit des „Core“-Mediators führt zu einer K28-Hypersensitivität, wohingegen der Verlust einer Untereinheit im Srb8-11-Modul („CDK-Modul“) zu einer K28-Resistenz führt (Carroll *et al.* 2009). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefundenen Resistenzen der Mutanten $\Delta cse2$, $\Delta ssn8$, $\Delta ssn2$ und $\Delta sin4$ wurden allerdings bei Carroll *et al.* nicht beschrieben.

Neben den getesteten Koaktivatoren, die bei der Initiation der Transkription involviert sind, wurden die Elongationsfaktoren Paf1 und THO/TREX im Deletionsscreen gegen K28 getestet. Bei letzterem konnten keine auffälligen K28-Phänotypen erkannt werden. Der Paf1C war hingegen von besonderem Interesse, da die Untereinheit Ctr9p im Y2H-Assay auf genetischer Ebene mit K28 α interagiert (Reiter 2004). Der Paf1-Komplex setzt sich aus den Untereinheiten Paf1p, Ctr9p, Cdc73p, Rtf1p und Leo1p zusammen und ist u.a. an der Rekrutierung transkriptioneller Aktivatoren, Histon-modifizierender Faktoren und 3'-Prozessierungsfaktoren beteiligt. Mutationen des Paf1C führen zu einer veränderten Genexpression (Mueller & Jaehning 2002, Jaehning 2010). Dass der Komplex eine große Rolle im Zellzyklusgeschehen spielt, wird durch die Beobachtung deutlich, dass es sich bei 30 % der Gene, die in einer $\Delta paf1$ -Mutante herunterreguliert sind, um Zellzyklus-regulierte Gene handelt (Porter *et al.* 2002). Wie bereits beschrieben, ist für die Rekrutierung des Paf1C an die DNA der CDK-Zyclin-Komplex Bur1p/Bur2p nötig (Larabee *et al.* 2005), wobei Bur2p möglicherweise einen Interaktionspartner von K28 α darstellt. Den Untereinheiten Paf1p und Ctr9p konnte eine Funktion bei der Transkription der G1/S-Zykline dahingehend zugeschrieben werden, dass bei deren Deletion u.a. die *CLN2*-Transkription erheblich beeinträchtigt ist (Koch *et al.* 1999). Interessanterweise zeigten die $\Delta paf1$ - und $\Delta ctr9$ Mutante einen äußerst starken K28-hypersensitiven Phänotyp. Es ist anzunehmen, dass bei diesen Mutanten ein kumulativer Effekt auftritt. Da durch das Fehlen von *PAF1* und *CTR9* die Menge an G1/S-Zyklinen schon herabgesetzt ist, ist der Übergang von der G1- zur S-Phase ohnehin für diese Zellen schwierig. Die Arretierung des Zellzyklus durch K28 läuft daher in diesen Zellen effektiver ab. Dass die Vitalität der Zellen insgesamt herabgesetzt ist, äußerte sich auch in der deutlich erhöhten Sensitivität gegenüber dem ionophor wirkenden Killertoxin K1. Neben den G1/S-Zyklinen ist der Paf1-Komplex für die Expression vieler weiterer SBF- und MBF-regulierter Gene nötig, u.a. auch für die Ribonukleotidreduktase Rnr1p. In $\Delta paf1$ Mutanten ist die Menge dieses für die Einleitung der S-Phase essentiellen Enzyms deutlich vermindert (Porter *et al.* 2002). Eine Inhibierung des Paf1-Komplexes durch K28 hätte somit ebenfalls eine Abnahme von Rnr1p zur Folge, wodurch sich die K28-induzierte Hemmung der DNA-Synthese erklären ließe. Tatsächlich konnte in der Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq gezeigt werden, dass die Expression von *RNR1* durch K28 herunterreguliert wird

(s.u.). Erwähnenswert ist an dieser Stelle noch die genetische Interaktion zwischen der Paf1-Komplex-Untereinheit Rft1p und TBP, welches ebenfalls mit K28 α interagiert (Stolinski *et al.* 1997). Ein weiterer interessanter Aspekt bezüglich der transkriptionellen Regulation des Zellzyklus liegt in der Verbindung zwischen dem Paf1-Komplex und dem TBP-assoziierten Faktor Taf1p (TAF_{II}145), welcher zuvor bereits als mögliches „Target“ von K28 in Betracht gezogen wurde (Reiter 2004). Bei den TAF_{II}s handelt es sich um Transkriptions-aktivierende Proteine, die zusammen mit TBP den generellen Transkriptionsfaktor TFIID bilden (Goodrich & Tjian 1994, Burley & Roeder 1996, Green 2000). Je nach dem, welches Gen exprimiert wird, assoziieren unterschiedliche TAF_{II}s mit TBP. Taf1p ist dabei in die Transkription der G1/S-Zykline Cln1p, Cln2p, der S-Zykline Clb5p und Clb6p, sowie der Pho85p-aktivierenden Zykline Pcl1p und Pcl2p involviert (Walker *et al.* 1997). Als essentielles Protein stellt Taf1p ein optimales „Target“ für K28 dar, da bei dessen Inaktivierung die Transkription der G1/S- und S-Zykline vollständig zum Erliegen kommt und die Zellen in der späten G1-Phase arretieren (Walker *et al.* 1997). Der Mechanismus, der zur Inaktivierung der *CLN1* und *CLN2* Transkription führt, steht dabei im Zusammenhang mit dem Paf1-Komplex. Die Inaktivierung von Taf1p geht zunächst mit einer deutlichen Abnahme der *CTR9* mRNA einher, die erst anschließend zur Abnahme der G1/S-Zykline führt (Holstege *et al.* 1998, Porter *et al.* 2002). Da Zellen die Deletion von Taf1p nicht überleben, konnte dieser Regulator im Rahmen des hier durchgeführten „Deletionsscreens“ nicht getestet werden. Neben den Funktionen bei der transkriptionellen Regulation des Zellzyklus ist es aufgrund der von Reiter und der in dieser Arbeit gesammelten Daten dennoch sinnvoll, Taf1p und die Komponenten des Paf1-Komplex bei weiterführenden Experimenten erneut in den Fokus zu stellen.

Neben der Δ *paf1* und Δ *ctr9* Mutante zeigten auch die Mutanten der CTD-Kinase 1 (CTDK-1) Δ *ctr1* und Δ *ctr3* einen ebenso starken K28-hypersensitiven Phänotyp. Bei CTDK-1 handelt es sich um einen Regulator der RNAPII, welcher die C-terminale Domäne der größten RNAPII-Untereinheit Rpb1p hyperphosphoryliert, wodurch die Transkriptionselongation stimuliert wird (Lee & Greenleaf 1997). Zellen, die keine funktionelle CTDK-1 besitzen, zeichnen sich durch langsames Wachstum und Kältesensitivität aus (Lee & Greenleaf 1991). Eine Funktion bei der Zellzyklusregulation ist CTDK-1 bislang nicht zugeschrieben (Hautbergue & Goguel 1999). Auffallend ist, dass im Deletionsscreen die stärksten K28-hypersensitiven Phänotypen bei Mutanten gefunden wurden, bei denen die Transkriptionselongation gestört ist. Aufgrund der ebenfalls starken K1-Sensitivität dieser Mutanten kann davon ausgegangen werden, dass die Vitalität der Zellen insgesamt stark reduziert ist. Dennoch stellt sich die Frage, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen K28-Hypersensitivität und gestörter Transkriptionselongation gibt. Dass durch Störung der Transkriptionselongation auch das Fortschreiten im Zellzyklus gestört sein kann, wurde

bereits oben am Beispiel des Paf1-Komplexes und dessen Bedeutung bei der Expression der G1/S-Zykline beschrieben.

Die im Deletionsscreen mitunter interessantesten Ergebnisse konnten durch die Untersuchung von Deletionsmutanten der RNAPII gewonnen werden. Das RNAPII-„Core“-Enzym setzt sich aus den 12 UE Rpb1p bis Rpb12p zusammen und bildet zusammen mit den Transkriptionsfaktoren das RNAPII-Holoenzym, welches die Transkription von mRNA-Genen durchführt. Von den 12 Untereinheiten sind lediglich Rpb4p und Rpb9p für das Wachstum von Hefen unter Standardbedingungen nicht essentiell. Lediglich unter Stressbedingungen wie z.B. Nährstoffmangel oder erhöhter Temperatur sind diese Untereinheiten für das Überleben der Zellen obligatorisch (Woychik *et al.* 1991, Choder & Young 1993). Eine gemeinsame Funktion konnte beiden UE bei der Transkriptionsvermittelten DNA-Reparatur zugeordnet werden (Li & Smerdon 2002). Erstaunlicherweise zeigte sowohl die $\Delta rpb4$ als auch die $\Delta rpb9$ Deletionsmutante eine Resistenz gegen K28. In Untersuchungen, bei denen Rpb4p bzw. Rpb9p in ihrer jeweiligen Deletionsmutante überexprimiert wurden, bestätigte sich, dass die Resistenz tatsächlich auf das Fehlen der jeweiligen RNAPII-Untereinheit zurückzuführen ist. In beiden Fällen wurde durch die Überexpression die K28-Resistenz aufgehoben und die Zellen reagierten wieder sensitiv auf das Toxin. Rpb4p bildet zusammen mit Rpb7p einen Subkomplex der RNAPII, dem zahlreiche Funktionen u.a. bei der Stressantwort, der Sporulation, der Aktivator-abhängigen Transkription und dem mRNA-Export zugeschrieben werden. Nach einem diskutierten Modell moduliert der Rpb4p/Rpb7p-Subkomplex die Interaktionen zwischen RNAPII-assoziierten Faktoren und der RNAPII, sodass je nach Bedingung spezifische Gene transkribiert werden (Armache *et al.* 2005, Samapath & Sadhale 2005). Im Zusammenhang mit K28 ist nun denkbar, dass durch das Fehlen von Rpb4p das „Target“ von K28 nicht exprimiert wird, wodurch die Zellen nicht mehr sensitiv auf das Toxin reagieren. Da K28 allem Anschein nach jedoch mehrere „Targets“ besitzt, müssten diese alle in einer $\Delta rpb4$ Mutante fehlen. Daher ist nicht auszuschließen, dass die Resistenz der $\Delta rpb4$ Mutante auf einem anderen Mechanismus basiert. Ebenso wie Rpb4p ist Rpb9p wichtig bei der Transkription unter Stressbedingungen. $\Delta rpb9$ Mutanten zeigen eine deutliche Temperatur- und Kältesensitivität (Woychik *et al.* 1991). Daneben kontrolliert Rpb9p die Feinabstimmung der Transkription (Walmacq *et al.* 2009). $\Delta rpb9$ Mutanten zeigen, dass Rpb9p z.B. für die korrekte Auswahl des Transkriptionsstarts nötig ist. Daher besitzen diese zwar kein vermindertes Transkriptlevel, aufgrund einer Transkriptionsinitiation „upstream“ des eigentlichen Transkriptionsstarts sind die Transkripte allerdings länger als in Wildtypzellen (Hull *et al.* 1995). Interessanterweise gibt es Hinweise, dass Rpb9p auch an der Regulation der Transkriptionselongation beteiligt ist (Hemming & Edwards, 2000, Hemming *et al.* 2000). Dass der K28-induzierte Zellzyklusarrest möglicherweise auf einer Hemmung dieses

Prozesses basiert, wurde im Zusammenhang mit dem Paf1-Komplex und der CTDK-1 bereits diskutiert. Zudem befinden sich *RPB9* und *PAF1* in einer synthetisch letalen Interaktion, wodurch eine Verbindung zwischen dem Paf1-Komplex und Rpb9p offenbart wird (Betz *et al.* 2002). Eine abschließende Erklärung, auf welchem Mechanismus die Resistenz der $\Delta rpb4$ und $\Delta rpb9$ Mutanten beruht, kann auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht erbracht werden. Direkte Zusammenhänge zwischen diesen RNAPII-Untereinheiten und der Zellzyklusregulation sind bisher in der Literatur nicht beschrieben, wodurch eine exakte Deutung der Ergebnisse schwierig ist. Die Daten untermauern jedoch die Hypothese, wonach der K28-induzierte Zellzyklusarrest auf einer Hemmung der Transkriptionsmaschinerie beruht.

Insgesamt wurden im Deletionsscreen 19 Mutanten mit ausgeprägter Hypersensitivität gegen K28 identifiziert. Nur sehr wenigen dieser Mutanten ist eine direkte Funktion bei der Zellzyklusprogression zugeschrieben. Lediglich für *GCN5* (SAGA-Komplex) und *HTL1* (RSC) ist bekannt, dass sie wichtige Rollen im Zellzyklusgeschehen spielen (Zhang *et al.* 1998, Romeo *et al.* 2002). Bei der Interpretation dieser Ergebnisse müssen weiterhin zwei Sachverhalte beachtet werden. Zum einen sind bei keiner der hypersensitiven Mutanten alle zellulären Funktionen des jeweils deletierten Gens bekannt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Hypersensitivitäten darauf zurückzuführen sind, dass Prozesse gestört waren, die der Toxinwirkung unabhängig von der Transkriptions- oder Zellzyklusregulation entgegenwirkten. Wie in 4.1 beschrieben, kann beispielsweise eine erhöhte Sensitivität auch dadurch verursacht werden, dass durch Vergrößerung der Kernpore das Toxin effektiver in den Nukleus importiert wird. Zum zweiten muss beachtet werden, dass durch Deletion eines Gens möglicherweise die Vitalität der Zellen insgesamt herabgesetzt war. Dass dies bei den hier getesteten Mutanten sehr wahrscheinlich der Fall war, äußerte sich auch dadurch, dass alle K28-hypersensitiven Mutanten auch gleichzeitig gegen das Killertoxin K1 eine deutlich erhöhte Sensitivität zeigten. Eine endgültige Interpretation der hypersensitiven Phänotypen gestaltet sich demnach schwierig. Die Daten können nur im Kontext mit anderen Ergebnissen betrachtet werden. Sechs der insgesamt getesteten Mutanten zeigten im Deletionsscreen eine Resistenz gegen K28. Es handelte sich dabei um vier Untereinheiten des Mediator-Komplexes und um zwei Untereinheiten der RNAPII. Auch in diesem Fall muss bei der Interpretation beachtet werden, dass in Folge der Deletion viele zelluläre Prozesse gestört sein können, die zu einer verminderten K28-Sensitivität führten. Beispielsweise ist bekannt, dass in $\Delta rpb4$ Mutanten die Zellwandstruktur verändert ist (Bourbonnais *et al.* 2001), wodurch K28 womöglich ineffizienter von den Zellen aufgenommen wird. Auch im Falle der resistenten Mutanten sollte daher eine Interpretation nur im Kontext mit anderen Erkenntnissen stattfinden. Da diese Mutanten allerdings durch eine erhöhte K1-Sensitivität zeigten, dass ihre Viabilität insgesamt herabgesetzt war, kann

davon ausgegangen werden, dass K28 tatsächlich zelluläre Prozesse beeinflusst, bei denen die deletierten Gene *CSE2*, *SSN8*, *SSN2*, *SIN4*, *RPB4* und *RPB9* involviert sind. Aufbauend auf den Ergebnissen von Reiter (2004) legt die Gesamtheit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfassten Daten einen Einfluss von K28 α auf die Transkription nahe. Zur detaillierten Aufklärung der Wirkungsweise von K28 wäre es daher sinnvoll, den Fokus bei zukünftigen Arbeiten weiterhin auf die Transkriptionsmaschinerie zu legen.

Die Überexpression bestimmter G1/S-Regulatoren führt zur K28-Resistenz

Neben dem Deletionsscreen wurde zur Suche nach Proteinen, die am K28-induzierten Zellzyklusarrest beteiligt sind, eine Genüberexpressionsanalyse durchgeführt. Bei der Verwendung von Deletionsmutanten bestehen grundsätzlich mehrere Beschränkungen. Zum einen können nur nicht-essentielle Gene untersucht werden. Es ist naheliegend, dass es sich bei dem „Target“ von K28 um ein essentielles Protein handelt, da die Inhibierung eines nicht-essentiellen Proteins nicht zwangsläufig zu einem Zellzyklusarrest führt. Die Hemmung eines essentiellen Proteins hat hingegen zwangsläufig einen letalen Effekt zur Folge. Da K28 möglicherweise eine pleiotrope Wirkung besitzt, ist in dieser Hinsicht dennoch vorstellbar, dass zwei oder mehrere nicht-essentielle Proteine inhibiert werden, wodurch ein synthetisch letaler Effekt auftreten kann. Zum anderen können im Deletionsscreen lediglich „loss-of-function“ Mutationen untersucht werden. „Gain-of-function“ Mutationen, die ebenfalls zu einer veränderten K28-Sensitivität führen können, wurden daher durch die Überexpression ausgewählter Zellzyklusregulatoren untersucht. Anders als bei dem Deletionsscreen, in dem hauptsächlich Gene der Transkriptionsregulation untersucht wurden, lag der Fokus hier vor allem direkt auf der Zellzyklusmaschinerie und speziell auf den Regulatoren der G1/S-Transition.

Der Übergang von der G1- zur S-Phase wird in *S. cerevisiae* durch ein komplexes Netzwerk regulatorischer Proteine kontrolliert. Das G1-Zyklusregulatorprotein Cln3p ist dabei der Regulator, der im Komplex mit Cdc28p den Start eines neuen Zellzykluses einleitet (Tyers *et al.* 1993, Dirick *et al.* 1995, Stuart & Wittenberg 1995). Der exakte Mechanismus der Cln3p/Cdc28p-Aktivierung ist bisher nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass sich im 5'-UTR-Bereich der *CLN3*-mRNA ein „upstream open reading frame“ (uORF) befindet, der unter ungünstigen Bedingungen translatiert wird und die Expression von *CLN3* inhibiert (Polymenis & Schmidt 1997). Cln3p wird im Gegensatz zu allen anderen Zyklusregulatorproteinen während allen Zellzyklusphasen synthetisiert; ein leichter Anstieg der Expression ist allerdings in der G1-Phase festzustellen (McInerney *et al.* 1997, MacKay *et al.* 2001). Es wird daher davon ausgegangen, dass die Einleitung eines neuen Zellzykluses dosis-abhängig durch den Level an Cln3p-Molekülen reguliert wird (Cross 1988, Nash *et al.* 1988, Tyers *et al.* 1993). Durch die Aktivierung von

Cln3p/Cdc28p wird ein transkriptionelles Programm gestartet, durch das mehr als 200 G1-spezifische Gene transkribiert werden, die u.a. für den Übergang der Zellen von der G1- zur S-Phase verantwortlich sind (Cho *et al.* 1998, Spellman *et al.* 1998). Die Cln3p/Cdc28p-abhängige Aktivierung der dafür nötigen Transkriptionsfaktoren SBF und MBF erfolgt indirekt über das Inhibitorprotein Whi5p. Während der G1-Phase binden SBF und MBF bereits an ihre jeweiligen Promotor-Elemente, die Transkription ist jedoch durch zusätzliche Assoziation des Inhibitors Whi5p gehemmt. In der späten G1-Phase findet eine Cln3p/Cdc28p-abhängige Phosphorylierung von Whi5p statt, wodurch es von SBF dissoziiert und aus dem Nukleus exportiert wird. Infolgedessen bindet das RNAPII-Holoenzym an SBF- und MBF-abhängige Promotoren (Cosma *et al.* 2001), wodurch die Transkription der G1-spezifischen Gene gestartet wird (Costanzo *et al.* 2004, de Bruin *et al.* 2004). Ob MBF ebenfalls direkt durch Whi5p inhibiert wird, ist weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen (Taberner *et al.* 2009). Neben Whi5p besitzt der Cln3p/Cdc28p-Komplex weitere Substrate, wie z.B. Histon-Deacetylasen, die in der späten G1-Phase phosphoryliert werden (Wang *et al.* 2009). Die heterodimeren Transkriptionsfaktoren SBF und MBF enthalten beide den transkriptionellen Koaktivator Swi6p und die DNA-Bindeproteine Swi4p (SBF) bzw. Mbp1 (MBF) (Koch & Nasmyth 1994). Obwohl SBF und MBF jeweils ein bestimmtes Set an Genen aktivieren, zeigt sich eine funktionelle Redundanz (Bean *et al.* 1995, Partridge *et al.* 1997, Flick *et al.* 1998). So ist die Deletion von entweder *SWI4* oder *MBP1* nicht letal, führt aber zu einer veränderten Genexpression (Koch 1993, Costanzo *et al.* 2003). Die ersten aktivierten Gene im G1/S-Regulon und die mitunter wichtigsten Zellzyklusregulatoren, die durch SBF transkribiert werden, sind die G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p (Nasmyth & Dirick 1991, Ogas 1991, Eser 2011). Cln1p und Cln2p aktivieren im Komplex mit Cdc28p mehrere positive Rückkopplungsschleifen, wodurch die Irreversibilität des Zellzyklusstarts gewährleistet wird und die Zellen den „Start“-Punkt überschreiten können (Charvin *et al.* 2010). Neben weiteren wichtigen Funktionen an der G1/S-Transition, wie z.B. der Initiation der Knospenbildung und der Verdopplung des Spindelpolkörpers, sind sie für die Aktivierung der S-Phase-Zykline Clb5p und Clb6p verantwortlich (Bloom & Cross 2007).

Interessanterweise führt die Überexpression der G1- bzw. G1/S-Zykline zu einer verminderten K28-Sensitivität. Zellen, die Cln2p überexprimieren, zeigen sogar eine vollständige Resistenz gegen K28 (Reiter 2004). Diese Beobachtungen unterstreichen die Tatsache, dass sich Cln1p und Cln2p trotz deutlicher funktioneller Redundanz in ihrer Wirkung auf die G1/S-Transition unterscheiden. Cln1p scheint dabei einen schwächeren Einfluss zu besitzen, da z.B. die Kinetik der Knospenbildung, die Initiation der DNA-Replikation und die Aktivierung des „Start“-Programmes in einer $\Delta cln1$ Mutante nicht beeinflusst sind; $\Delta cln2$ Mutanten zeigen hingegen eine deutliche Verzögerung dieser Prozesse. An dieser Stelle am interessantesten ist die Beobachtung, dass durch ektopische

Expression von Cln2p (nicht allerdings von Cln1p) „Start“-Mutanten (z.B. die synthetisch letale Doppelmutante $\Delta swi4\Delta swi6$) gerettet werden können (Queralto & Igual 2004). Die Überexpression von Cln2p schützt somit die Zellen zum einen gegen das Killertoxin K28 und kann zum anderen die Deletion essentieller Zellzyklusregulatoren ausgleichen.

Um die von Reiter gemachten Beobachtungen näher zu untersuchen, richtete sich der Fokus daher zunächst auf das Zyklin Cln2p. Die Überexpression erfolgte unter Kontrolle des starken P_{TPP} -Promotors konstitutiv und unabhängig der Zellzyklusregulation (Romanos *et al.* 1992, Townsley *et al.* 1994), wodurch in der Zelle stets ein hohes Level an Cln2p-Molekülen zur Aktivierung der G1/S-Transition vorhanden war. Aus diesem Grund wurde *CLN2* im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter Kontrolle des eigenen Promotors überexprimiert und die verwendeten Zellen auf K28-Sensitivität getestet. Die Expression erfolgte wie bei Reiter auf einem „multicopy“-Plasmid; der Versuchsansatz unterschied sich somit nur in der Wahl des Promotors. Im MBA-Test zeigte sich, dass die Überexpression von *CLN2* nicht zu einer K28-Resistenz führt, wenn das Zyklin unter Kontrolle seines eigenen Promotors steht. Die Zellen zeigten eine dem Wildtyp ähnliche K28-Sensitivität. Dieses Ergebnis stellt eine wichtige Ergänzung zu den von Reiter gemachten Beobachtungen dar. *CLN2* schützt nur dann Zellen vor K28, wenn dessen Überexpression konstitutiv und unabhängig der Zellzyklusregulation erfolgt. Die Tatsache, dass Zellen nach K28-Behandlung nicht in der Lage sind, *CLN2* unter Kontrolle des eigenen Promotors ektopisch zu exprimieren, unterstützt ebenfalls die Annahme, dass durch K28 die *CLN2*-Transkription beeinträchtigt ist. Im Rahmen der Überexpressionsstudien wurde daher untersucht, ob die konstitutive Überexpression der SBF- und MBF-Untereinheiten *SWI4*, *SWI6* und *MPB1*, die zur Expression der G1/S- und S-Zykline nötig ist, ebenfalls zu einer verminderten K28-Sensitivität führt. Durch ein erhöhtes Level der SBF-Aktivität sollte auch die Expression der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p effizienter erfolgen und die Zellen aufgrund der höheren G1/S-Zyklin-Aktivität daher weniger sensitiv oder sogar resistenz gegenüber K28 reagieren. Der Transkriptionsfaktor MBF induziert u.a. die Expression der S-Phase-Zykline Clb5p und Clb6p (Schwob & Nasmyth 1993). Reiter konnte zeigen, dass die Überexpression dieser Zykline keine Auswirkung auf die K28-Sensitivität hat (2004); dennoch wurde im Rahmen der Versuche untersucht, ob die Überexpression der MBF-Untereinheit *MBP1* einen Einfluss auf die K28-Sensitivität hat. Da die ektopische Expression von *MBP1* in wildtypischen *S. cerevisiae* Stämmen letal ist, musste eine Mutante verwendet werden, die eine Deletion des Gens *SKN7* aufwies. Skn7p und Mbp1p bilden als Heterodimer einen weiteren Transkriptionsfaktor, der in die G1/S-Transition involviert zu sein scheint. Die Überexpression einer der beiden Untereinheiten ist letal und kann nur durch Deletion der jeweils anderen Untereinheit von den Zellen überlebt werden (Bouquin *et al.* 1999). Die Deletionsmutante $\Delta skn7$ zeigte eine dem Wildtypstamm BY4742 ähnliche Sensitivität gegenüber K28. Auch bei

Überexpression von *MBP1* konnte keine signifikante Änderung in der K28-Sensitivität festgestellt werden. Die Überexpression von *SWI4*, der DNA-bindenden Untereinheit von SBF führte zu einer signifikant erhöhten Sensitivität. Da allerdings auch die K1-Sensitivität signifikant anstieg, muss davon ausgegangen werden, dass durch *SWI4*-Überexpression die Vitalität der Zellen insgesamt stark herabgesetzt war. Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen überein, wonach Zellen durch eine *SWI4*-Überexpression in ihrer Zellzyklusprogression gestört sind (Sopko *et al.* 2006). An dieser Stelle interessant ist die Tatsache, dass die Deletionen von *SWI4* und *PAF1* synthetisch letal sind. Der Paf1-Komplex und speziell dessen Untereinheit *CTR9* stellt, wie bereits erwähnt, ein mögliches K28-„Target“ dar, da er an der SBF-regulierten Transkription der G1/S-Zykline beteiligt ist (Betz *et al.* 2002, Porter *et al.* 2002). Im Gegensatz zu den beiden DNA-bindenden Untereinheiten *MBP1* und *SWI4* der Transkriptionsfaktoren SBF und MBF führte die Überexpression der koaktivierenden Untereinheit *SWI6* zu einem nahezu K28-resistenten Phänotyp. Die Überexpression von *SWI6* führt gewöhnlich zu einer herabgesetzten Vitalität der Zellen (Sopko *et al.* 2006), die sich auch im MBA-Test in einer deutlich gesteigerten K1-Sensitivität äußerte. Dennoch schützt ein hoher Level an Swi6p die Zellen vor der Wirkung von K28. Swi6p wirkt bei der G1/S-Transition im gleichen „Pathway“ wie Cln1p und Cln2p, deren Überexpression ebenfalls zu einer verminderten K28-Sensitivität bzw. Resistenz führt. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass infolge der *SWI6*-Überexpression auch ein erhöhter Level an Cln2p in den Zellen vorhanden war, wodurch die Zellen einen beinahe resistenten K28-Phänotyp zeigten. Im Hinblick auf die Rolle der G1/S-Zykline, im Speziellen von Cln2p stimmen die Ergebnisse aus den Überexpressionsstudien und den von Reiter (2004) durchgeführten Northern-Analysen überein und ergänzen sich gegenseitig. Demnach induziert K28 eine Abnahme dieser Zykline, wohingegen deren Überexpression die Zellen vor der Toxinwirkung schützt. Dennoch stellt sich die Frage, ob die Abnahme der *CLN1*- und *CLN2*-mRNA die Ursache oder die Folge des K28-induzierten Zellzyklusarrests ist. Eine diesbezüglich weitere offene Frage betrifft die Morphologie des terminalen Phänotyps. K28-behandelte Zellen arretieren vor Beginn der S-Phase mit einer mittelgroßen Knospe. Unklar ist in dem Zusammenhang, durch welchen Mechanismus die Knospenbildung initiiert wird. Im physiologischen Zustand wird die Knospenbildung durch die Aktivität der Cln1p/Cdc28p- und Cln2p/Cdc28p-Komplexe initiiert, jedoch wird die Transkription der G1/S-Zykline durch K28 gehemmt. Es sind mehrere Mechanismen vorstellbar, durch die die Bildung der Knospe trotz Hemmung von Cln1p und Cln2p erklärt werden kann. Die einfachste Möglichkeit besteht darin, dass die Initiation der Knospenbildung zeitlich vor der Toxinwirkung eintritt, sodass noch genügend Cln1p- und Cln2p-Moleküle vorhanden sind, um die Ausbildung der Knospe einzuleiten. Alternativ zu den G1/S-Zyklinen können jedoch auch die Zykline Pcl1p und Pcl2p, die mit der CDK Pho85p assoziieren und diese aktivieren, die Funktionen von

Cln1p und Cln2p übernehmen (Measday *et al.* 1997). Allerdings wird die Expression dieser Zykline ebenfalls durch SBF reguliert (Dirick *et al.* 1995, Futcher 1996), sodass davon auszugehen ist, dass bei einer Transkriptionseinibrierung der G1/S-Zykline auch die Transkription von Pcl1p und Pcl2p gehemmt ist. Im Falle von Pcl1p konnte dessen Herunterregulierung durch K28 im Rahmen der Transkriptomanalyse (s.u.) bestätigt werden. Ein weiterer Mechanismus, mit dem die Knospenbildung erklärt werden kann, basiert auf dem Protein Bck2p. Dieses induziert die Expression verschiedener Zellzyklusregulatoren unabhängig der Zellzyklusphase und unabhängig der Transkriptionsfaktoren SBF und MBF (Ferrezzuelo *et al.* 2009). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass $\Delta cln3$ Deletionsmutanten durch Mutationen in *BCK2* in der späten G1-Phase arretieren. Durch Überexpression von *CLN2* kann der Arrest aufgehoben werden. Weiterhin sind die mRNA-Level von *CLN1* und *CLN2* in diesen Zellen sehr gering (Epstein & Cross 1994, Di Como *et al.* 1995). Wie bereits beschrieben, treten die gleichen Beobachtungen auch bei K28-induziertem Zellzyklusarrest auf. Es ist daher vorstellbar, dass Bck2p in K28-behandelten Zellen in der Lage ist, die Knospung zu initiieren, jedoch den Übertritt von der G1- in die S-Phase, durch beispielsweise eine K28-abhängige Sic1p-Stabilisierung (s.u.) nicht einleiten kann.

Neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene wird der Übergang von der G1- zur S-Phase ebenfalls durch die kontrollierte Degradation verschiedener Proteine reguliert. Ein Hauptsubstrat dieses Degradations-„Pathways“ stellt der CDK-Inhibitor Sic1p dar, der in der späten G1-Phase die S-Zykin/Cdc28p-Komplexe in einem inaktiven Zustand hält. Clb5p und Clb6p werden MBF-abhängig und zeitgleich mit den G1/S-Zyklinen Cln1p und Cln2p exprimiert und bilden jeweils einen Zykin/CDK-Komplex mit Cdc28p (Epstein & Cross 1992, Schwob & Nasmyth 1993). Um den korrekten zeitlichen Ablauf der G1/S-Transition zu gewährleisten, werden diese Komplexe allerdings zunächst durch Sic1p inhibiert (Schwob *et al.* 1994, Schneider 1996). Erst die aktiven G1/S-Zykin/Cdc28p-Komplexe initiieren die proteasomale Degradation von Sic1p durch dessen Phosphorylierung. Infolgedessen wird die S-Phase durch Clb5p und Clb6p eingeleitet. Tatsächlich stellt die Sic1p-Phosphorylierung die einzige essentielle Funktion der G1- und G1/S-Zykline dar (Verma *et al.* 1997). Dies zeigt sich u.a. dadurch, dass die Dreifachmutante $\Delta cln1\Delta cln2\Delta cln3$ nur dann noch lebensfähig ist, wenn *SIC1* deletiert wird (Schneider *et al.* 1996). Im Zusammenhang mit dem K28-induzierten Zellzyklusarrest ist daher ebenso vorstellbar, dass der Abbau von Sic1p gehemmt wird, wodurch die Zellen nicht in die S-Phase eintreten könnten. Verantwortlich für den Abbau von Sic1p ist der Ubiquitin-Ligase-Komplex SCF, der durch Cdc28p phosphoryliertes Sic1p ubiquitiniert und somit für die proteasomale Degradation markiert. Der „Core“-Komplex setzt sich aus den Proteinen Skp1p, dem Cullin-ähnlichen Cdc53p und dem E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym Cdc34p zusammen. Zur

funktionellen Aktivität ist zusätzlich eines von mehreren F-Box-Proteinen nötig. Am Übergang der G1- zur S-Phase wichtig sind dabei Cdc4p und Grr1p. Die Substratspezifität des SCF-Komplexes ändert sich, je nachdem welches F-Box-Protein assoziiert. SCF^{CDC4} ubiquitiniert u.a. Sic1p, Far1p und Cdc6p; SCF^{GRR1} ist für die Ubiquitinierung der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p verantwortlich (Schwob *et al.* 1994, Barral 1995, Skowyra 1997, Willems *et al.* 1999, Desalle & Pagano 2001). Bei Cdc4p und Cdc34p handelt es sich um essentielle Proteine, die daher nicht als Deletionsmutanten vorlagen. Interessanterweise zeigt eine temperatur-sensitive *cdc34^{ts}* Mutante einen Phänotyp, der dem K28-induzierten, terminalen Phänotyp sehr ähnlich ist. Die Zellen arretieren mit einer Knospe und einem präreplikativen DNA-Gehalt am G1/S-Übergang (Schneider *et al.* 1996). Die S-Phase kann in diesen Zellen nicht eingeleitet werden, was auch bei einer temperatursensitiven *cdc4^{ts}* Mutante der Fall ist (Schwob *et al.* 1994). Im Gegensatz dazu sollte eine Überexpression von *CDC4* bzw. *CDC34* zu einer effizienteren Einleitung der S-Phase führen, da der Inhibitor Sic1p schneller abgebaut werden sollte. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob auch die Überexpression von *CDC4* und *CDC34* zu einer verminderten K28-Sensitivität führt. Zusätzlich wurde der CKI *SIC1* gleichermaßen getestet. In allen Fällen zeigten die Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Killertoxin K1, woraus sich eine allgemeine Abnahme der Vitalität schließen lässt. Die Überexpression von *CDC4* und die von *SIC1* führten ebenso zu einer gesteigerten K28-Sensitivität. Dies ist im Falle von *SIC1* nicht verwunderlich, da bei einer Erhöhung des intrazellulären Sic1p-Levels, aufgrund der gesteigerten Hemmung der S-Zyklus/Cdc28p-Komplexe, die Einleitung der S-Phase deutlich erschwert ist. Die Überexpression von *CDC34* hingegen führte, trotz Abnahme der Vitalität, zu einem nahezu K28-resistenten Phänotyp. Es kann davon ausgegangen werden, dass auch in diesem Fall – ähnlich der Überexpression der G1/S-Zykline *CLN1* und *CLN2* oder von *SWI6* – der Übergang von der G1- zur S-Phase effizienter abläuft, was die Wirkung von K28 erschwert.

Im Zusammenhang mit der möglichen, durch K28 hervorgerufenen Hemmung des CKI Sic1p muss auch die Rolle der Casein Kinase CK2 betrachtet werden. Bei dieser Ser/Thr Proteinkinase handelt es sich um ein heterotetrameres Protein, das sich bei Hefe aus den katalytischen Untereinheiten α und α' sowie aus den regulatorischen Untereinheiten β und β' zusammensetzt, die durch die Gene *CKA1*, *CKA2*, *CKB1* und *CKB2* kodiert werden (Glover 1998, Glover *et al.* 1994). CK2 kommt in allen eukaryotischen Zellen vor und ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie beispielsweise Signaltransduktion, Genexpression, „Chromatin-Remodeling“ und programmiertem Zelltod beteiligt. Dementsprechend hoch ist auch die Zahl an Substraten, von denen bereits vor zehn Jahren über 300 bekannt waren (Meggio & Pinna 2003). Unter den Substraten finden sich beispielsweise auch Untereinheiten aller drei RNA-Polymerasen, wodurch die Rolle von CK2 auch bei der Regulation der Transkription ersichtlich wird (Glover 1998, Ackermann *et al.* 2001). Unlängst konnte

ebenso eine Funktion von CK2 bei der Zellzyklusprogression beschrieben werden. Dabei liegt der Zeitpunkt, bei dem CK2 aktiv ist, am Ende der G1-Phase nach Überschreiten von „Start“ aber noch vor der DNA-Synthese (Hanna *et al.* 1995). Genau an dieser Stelle des Zellzyklus tritt auch die arretierende Wirkung von K28 auf. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass bei Deletion einer Untereinheit von CK2 u.a. auch die Expression von *CLN2* unterdrückt ist, dessen mRNA-Level auch durch K28 abnimmt (Barz *et al.* 2003, Tripodi *et al.* 2007). Insgesamt ist durch die Deletion einzelner CK2-Untereinheiten die Expression von etwa einem Viertel aller zellzyklusregulierten Gene in der G1-Phase betroffen (Pyerin *et al.* 2005). Im Zusammenhang mit Sic1p konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um ein Substrat von CK2 handelt und Sic1p durch CK2 phosphoryliert und dadurch reguliert wird (Cocchetti *et al.* 2004, Barberis *et al.* 2005). Diesbezüglich konnte in Interaktionsstudien eine Interaktion zwischen Sic1p und der katalytischen α' -Untereinheit von CK2 Cka2p nachgewiesen werden (Cocchetti *et al.* 2006). Genau diese CK2-Untereinheit wurde von Reiter (2004) mittels TAP-Analyse und anschließender MALDI-Untersuchung als potentieller Interaktionspartner von K28 α identifiziert. Weiterhin auffällig ist, dass $\Delta cka2$ Mutanten im MBA nahezu resistent gegen K28 sind (Reiter 2004). Es ist vorstellbar, dass K28 durch Interaktion mit Cka2p die CK2-abhängige Phosphorylierung von Sic1p beeinflusst, wodurch es zu einer Stabilisierung von Sic1p kommt und damit ein Arrest vor Beginn der S-Phase eingeleitet wird. Dies würde auch erklären, warum die Zellen trotz Arrest die Ausbildung der Knospe einleiten, da bei einer Sic1p-Stabilisierung dieser Prozess nicht gestört wird. Tatsächlich nimmt durch Hemmung der CK2-Aktivität die Menge an Sic1p in der Zelle zu, wodurch die Aktivität der S-Phase-Zyklin/Cdc28p-Komplexe drastisch abnimmt (Tripodi *et al.* 2007). In ersten Interaktionsstudien war es dennoch nicht möglich, mittels Ko-Immunopräzipitation und „Pulldown“-Assay, eine Interaktion zwischen Cka2p und K28 α biochemisch zu verifizieren (Buck 2012). Dennoch lohnt es sich, die Rolle von CK2 im K28-induzierten Zellzyklusarrest näher zu untersuchen. Erwähnenswert ist an dieser Stelle der Zusammenhang zwischen CK2 und dem Protein Zds1p. Dieses wurde ebenfalls von Reiter (2004) als potentieller Interaktionspartner von K28 α in einer Y2H-Analyse identifiziert. Die Überexpression von Zds1p gleicht eine temperatursensitive Mutation in der CK2-Untereinheit Cka2p aus und Zds1p interagiert mit CK2 auf genetischer Ebene (Bandhakavi *et al.* 2003). Interessanterweise wird auch Zds1p eine Rolle bei der Regulation der Zellzyklusprogression zugeschrieben, wenngleich sich die Aktivität von Zds1p auf den Mitoseeintritt und -austritt beschränkt (Yu *et al.* 1996, Rossio & Yoshida 2011, Wicky *et al.* 2011). Somit stellt auch Zds1p einen Zellzyklusregulator dar, der als Angriffspunkt von K28 in Frage kommt. Biochemische Studien, mit denen die Interaktion zwischen K28 α und Zds1p verifiziert werden sollten, blieben bisher jedoch erfolglos (Meidlinger 2001, Poppek 2011).

Das oben beschriebene Szenario stellt ein Beispiel dar, bei dem durch Mutation einer CK2-Untereinheit Sic1p stabilisiert wird, was in einem Zellzyklusarrest vor der S-Phase resultiert. Daneben ist selbst ein physiologischer Mechanismus bekannt, bei dem durch Akkumulation von Sic1p die Arretierung des Zellzyklus eingeleitet wird. Unter Osmostress wird in Hefezellen die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) Hog1p aktiviert (de Nadal *et al.* 2011), die Sic1p phosphoryliert und somit dessen Degradation inhibiert. Zusätzlich wird auch durch Hog1p die Expression der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p gehemmt, wodurch ebenfalls der Abbau von Sic1p herabgesetzt wird (Escoté *et al.* 2004, Zapater *et al.* 2005). Derselbe oder ein ähnlicher Mechanismus könnte ebenfalls von K28 genutzt werden, um den Zellzyklus zu arretieren, zumal die Abnahme der G1/S-Zykline bereits bestätigt wurde (Reiter 2004). Auch das Makrolid Rapamycin induziert einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Herunterregulation der G1- und G1/S-Zykline im Zusammenspiel mit einer Hochregulation von Sic1p (Zinzalla *et al.* 2007). Insgesamt wird an den Beispielen von CK2, Hog1p und Rapamycin deutlich, dass Sic1p ein interessantes „Target“ darstellt, mit dem ein Zellzyklusarrest vor Beginn der S-Phase induziert werden kann. Findet keine Degradation von Sic1p statt, kann die S-Phase und die dabei ablaufende DNA-Replikation nicht eingeleitet werden. Aus diesem Grund wurde versucht, eine durch K28 induzierte Akkumulation von Sic1p zu verifizieren. Dabei wurde zur Detektion von Sic1p im Western-Blot im Genom der Hefe an die Sequenz von *SIC1* ein „V5-Tag“ angefügt. Wie bereits beschrieben, blieb der Nachweis einer Sic1p-Akkumulation erfolglos. Neben Sic1p wurde in diesem Zusammenhang eine mögliche Akkumulation weiterer Proteine untersucht, um den K28-induzierten Zellzyklusarrest näher zu charakterisieren. Darunter befanden sich neben den G1/S- und S-Zyklinen auch Cdc6p, ein Regulator der Initiation der DNA-Synthese. Diese wird in einem zweistufigen Prozess eingeleitet. Während der G1-Phase, in der Cdc28p noch nicht aktiv ist, bindet Cdc6p im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen und Proteinkomplexen an die DNA und bildet so einen noch inaktiven prä-Replikationskomplex (prä-RC). Bei Einleitung eines neuen Zellzyklus wird Clb5- und Clb6-abhängig Cdc6p phosphoryliert, wodurch dieses vom prä-RC dissoziiert und die Replikation der DNA initiiert wird. Die Phosphorylierung von Cdc6p stellt ein Signal für dessen Abbau via Ubiquitin-Proteasom-System dar. Die Ubiquitinierung von Cdc6p basiert ebenso wie die von Sic1p auf dem Ubiquitinligase-Komplex SCF (Drury *et al.* 1997, Elsasser *et al.* 1999). Eine K28-abhängige Akkumulation von Cdc6p würde somit ebenfalls einen weiteren Hinweis darauf geben, ob der SCF-Komplex durch K28 inhibiert wird bzw. ob bereits die Clb5p-/Clb6p-abhängige Phosphorylierung von Cdc6p gehemmt wird.

Im Rahmen der Überexpressionsstudien wurden neben den bisher beschriebenen Proteinen, die an der Regulation der G1/S-Transition beteiligt sind, weitere Proteine eingesetzt und deren Einfluss auf die K28-Sensitivität bei Überexpression untersucht. Es handelte sich

dabei um die Proteine Elm1p, Shp1p, Ssn8p und Cse2p, deren jeweilige Deletion zu einer vollständigen K28-Resistenz führte (Reiter 2004). Bei Elm1p handelt es sich um eine Ser/Thr-spezifische Kinase, die vor allem an morphologischen Vorgängen während der Mitose und Zytokinese beteiligt ist (Koehler & Myers 1997, Sreenivasan & Kellogg 1999, Bouquin *et al.* 2000). Erst später wurde erkannt, dass Elm1p auch in der G1-Phase wichtige Aufgaben erfüllt. Dies äußert sich z. B. dadurch, dass die Inhibierung der Elm1p-Kinaseaktivität in einer $\Delta cln1 \Delta cln2$ Doppelmutante letal ist (Sreenivasan *et al.* 2003). Daneben wird Elm1p auch eine Rolle bei der Inaktivierung von SBF zugeschrieben (Manderson *et al.* 2008). Shp1p ist ein Regulator der Phosphoprotein-Phosphatase 1 und an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Glykogenmetabolismus, Meiose, Translation, Chromosomensegregation und Zellzyklusprogression involviert (Zhang *et al.* 1995). Allein aufgrund dieser großen Zahl ist eine Deutung der potentiellen Rolle von Shp1p bei der K28-Wirkung schwierig. Ssn8p und Cse2p sind beides Untereinheiten des Mediator-Komplexes (Reeves & Hahn 2003), der im Rahmen der Mutantanalyse bereits ausführlich beschrieben wurde. Interessanterweise handelt es sich bei Ssn8p um ein Zyklin, das zusammen mit Ssn3p einen Zyklin-CDK-Komplex bildet, der durch Phosphorylierung der CTD an der transkriptionellen Regulation beteiligt ist (Kuchin *et al.* 1995, Liao *et al.* 1995). Mit Ausnahme von Ssn8p erhöhten sich durch die Überexpressionen sowohl die K28- als auch die K1-Sensitivitäten, weshalb davon auszugehen ist, dass auch in diesen Fällen allein durch die Überexpressionen die Zellen insgesamt in ihrer Vitalität geschwächt waren. Zellen, die Ssn8p überexprimierten, zeigten eine dem Wildtyp gleiche K28-Sensitivität; die K1-Empfindlichkeit wurde erhöht. Es kann spekuliert werden, dass auch hier durch die Überexpression die Vitalität der Zellen abnahm und die allgemeine Sensitivität der Zellen gegenüber toxischen Substanzen erhöht wurde. Diese erhöhte Empfindlichkeit tritt allerdings nicht bei K28 auf, sodass eine Rolle von Ssn8p bei der Toxinwirkung möglich ist, zumal die $\Delta ssn8$ -Deletionsmutante einen K28-resistenten Phänotyp hat. Insgesamt wird durch diese Daten der Fokus erneut auf den Mediator gerichtet.

K28 induziert eine Hemmung der RNAPII-abhängigen Transkription

Eine Vielzahl der von Reiter (2004) und der im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass K28 die Transkription Zellzyklus-regulatorischer Proteine hemmt, was schließlich zu einem Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- zur S-Phase führt. K28-behandelte Zellen zeigen beispielsweise eine Abnahme der mRNA-Level der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p, das TATA-Box bindende Protein TBP ist ein *in vitro* und *in vivo* Interaktionspartner von K28 α und eine Vielzahl an Mutanten mit Deletionen in Genen der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie sind resistent gegenüber K28. Die Transkription

stellt die höchste Ebene der Zellzyklusregulation dar und bietet daher einen idealen Angriffspunkt für ein Toxin. Dabei bieten sich dem Toxin vielfältige Möglichkeiten durch Inhibierung eines Proteins oder Proteinkomplexes, spezifisch die Transkription von Genen zu inhibieren, die den Übergang von der G1- zur S-Phase regulieren. Beispielsweise stellen das TATA-Box bindende Protein TBP im Zusammenspiel mit Taf1p sowie der Paf1-Komplex regulatorische Komponenten der RNAPII-abhängigen Transkriptionsmaschinerie dar, die spezifisch die Expression der G1/S-Zykline Cln1p und Cln2p kontrollieren (Walker *et al.* 1997, Koch *et al.* 1999).

Eine Transkriptomanalyse K28-behandelter Zellen sollte Aufschluss darüber geben, wie die globale Transkription durch K28 beeinflusst wird und ob die Transkription spezifischer G1/S-Gen-„Cluster“ durch K28 inhibiert wird. Zur globalen Analyse eines Transkriptoms bieten sich mehrere methodische Möglichkeiten. Neben der quantitativen „Real-Time“-PCR und Northern-Analysen stellten noch bis vor kurzem DNA-Microarrays die effizienteste Methode zur Transkriptomanalyse dar. Auch zur Analyse der biologischen Wirkung von Killertoxinen wurden in der Vergangenheit DNA-Microarrays eingesetzt. Dabei konnte die transkriptionelle Änderung der Genexpression in *S. cerevisiae* durch das Killertoxin PMKT aus *P. membranifaciens* untersucht werden (Santos *et al.* 2005, Santos & Marquina 2011). Seit einigen Jahren werden DNA-Microarrays als Methode zur Transkriptomanalyse durch RNA-Seq abgelöst. Diese Methode bietet vielfältige Vorteile gegenüber Microarrays in Bezug auf Dynamik, Auflösung, Sensitivität und wissenschaftliche Aussagekraft der daraus gewonnenen Daten. Ein Nachteil von Microarrays stellt beispielsweise das hohe „Hintergrundrauschen“ dar, das auf Kreuzhybridisierungen zurückzuführen ist, so dass Gene mit einem extrem niedrigen Expressionslevel bei einer Microarray-Analyse überhaupt nicht erfasst werden können. Da bei RNA-Seq jedes einzelne Transkript sequenziert wird, treten solche Hintergrundsignale wenig bis gar nicht auf. Genauso ist im Falle von Microarrays die Expressionsanalyse sehr stark exprimierter Gene schwierig bis unmöglich, da die Sonden auf dem Chip gesättigt werden können. Ein solches oberes Limit bei der Quantifizierung von Transkripten ist bei RNA-Seq nicht vorhanden. Dementsprechend hoch ist der Dynamikumfang bei der Detektion von Transkripten und reicht von wenigen Molekülen bis nahezu in den fünfstelligen Bereich (Wang *et al.* 2009). Schon allein durch diesen Umstand ist RNA-Seq zur Analyse einer differentiellen Genexpression prädestiniert. Untersuchungen belegen, dass bei einer Charakterisierung der differentiellen Genexpression durch RNA-Seq mehr Gene mit verändertem Transkriptionsmuster identifiziert werden können, als mit Microarrays (Guida *et al.* 2011). Da im Falle von RNA-Seq sämtliche Transkripte sequenziert werden, sind zur Transkriptomanalyse keine Informationen über die Genomsequenz des analysierten Organismus nötig. Im Gegensatz dazu muss bei Microarrays zur Generierung der Sonden die Sequenz der untersuchten Gene im Vorfeld bekannt sein. RNA-Seq

ermöglicht somit eine Transkriptomanalyse von Organismen, von denen kein Referenzgenom zum „mapping“ zur Verfügung steht (Grabherr *et al.* 2011). So konnte beispielsweise das Transkriptom des Wegerich-Schneckenfalters (*Melitaea cinxia*), einem Schmetterling, der kein Modellorganismus darstellt, mit Hilfe von RNA-Seq bestimmt werden (Vera *et al.* 2008). Neben den genannten Vorteilen gegenüber Microarrays eröffnen sich durch RNA-Seq Möglichkeiten zur Analyse des Transkriptoms eines Organismus, die vorher durch keine Methode gegeben waren. Mittels RNA-Seq gewonnene Daten enthalten vielfältige Informationen über die detaillierte Struktur der transkribierten mRNAs. Neben der eigentlichen Protein-kodierenden Sequenz werden ebenso der 5'- und der 3'-UTR-Bereich eines Transkriptes sequenziert, wodurch vielfältige Aussagen u.a. über die korrekte Position des Startcodons, eventuell vorhandene „upstream open reading frames“ (uORF) und die Heterogenität der 3'-Enden gemacht werden können (Nagalakshmi *et al.* 2008). Aufgrund der hohen Auflösung bis hin zur Einzelbase, ist es möglich, Sequenzvariationen wie beispielsweise SNPs („single nucleotide polymorphism“) zu detektieren. Auch die exakte Bestimmung von Exon-Exon-Verbindungen bei Intron-haltigen Genen kann durch RNA-Seq realisiert werden (Wang *et al.* 2009). Neben den Transkriptomen von *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, der Maus und des Menschen wurde auch bereits das von *S. cerevisiae* mittels RNA-Seq in einer hohen Auflösung charakterisiert. Die Analyse offenbarte eine bis dahin nicht bekannte Komplexität des Hefegenoms. Es zeigte sich u.a., dass etwa 74,5 % des Hefegenoms exprimiert werden und eine Vielzahl der Gene überlappend auf dem Watson- und Crick-Strang kodiert sind. Mehrere Transkripte wurden identifiziert, die in intergenischen Regionen lokalisiert sind. Des Weiteren wurden nahezu alle bis dahin beschriebenen Introns verifiziert und eine Vielzahl an Transkripten mit uORFs gefunden (Nagalakshmi *et al.* 2008).

All die Punkte zeigen deutlich, dass es sich bei RNA-Seq um eine hochsensitive Methode zur Analyse eines Transkriptoms und zur differentiellen Genexpression handelt, weswegen sie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam.

Sphäroplasten zeigen aufgrund der fehlenden Zellwand eine sehr hohe K28-Sensitivität, die sich durch einen schnellen Wachstumsarrest äußert (Reiter 2004, Sendzik 2006, Kelkel 2009). Deren Verwendung war für die Analyse des K28-induzierten Zellzyklusarrests mittels Transkriptomanalyse indes nicht möglich, da allein durch den Sphäroplastierungsprozess der Zellzyklus von *S. cerevisiae* beeinflusst wird (Doi & Doi 1982, Murakami & Livingston 1982). Ein Effekt von K28 auf den Zellzyklus wäre somit eventuell überdeckt worden. Als Alternative wurden Zellen verwendet, die das Letalkonstrukt präpro α intrazellulär exprimierten und einen Selbstkillerphänotyp zeigten. Durch „shut-off“-Experimente konnte der Zeitpunkt der Toxinwirkung auf sechs bis sieben Stunden näher eingegrenzt werden.

Die Transkriptomanalyse offenbarte eine enorme Änderung der Transkription infolge der K28-Wirkung. Insgesamt wurden durch die Expression des Letalkonstrukts präpro α 75 Gene hoch- und 1.237 herunterreguliert. Anhand der Expressionsraten der Markergene (*his3 Δ 1*; *leu2 Δ 10*; *lys2 Δ 10*; *ura3 Δ 10*) des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 konnte die Qualität der Daten beurteilt werden (Brachmann et al. 1998). Von den Genen *LEU2* und *LYS2* konnten keine zuordnbare „reads“ in der RNA-Seq-Analyse gefunden werden, da diese im Genom von BY4742 vollständig deletiert sind. Es wurde in allen Proben eine starke Expression des *URA3* Gens beobachtet, was dadurch erklärt werden kann, dass dieses Markergen im „multicopy“-Vektor pYES2.1-pp α kodiert ist, welcher zur Expression von präpro α verwendet wurde. Das *HIS3* Gen wurde ebenfalls in allen Proben zu einem geringen Anteil exprimiert. Der Stamm BY4742 besitzt das *his3 Δ 1* Allel, bei dem innerhalb des *HIS3* ORFs 187 bp deletiert sind (Daniel et al. 2006). Aufgrund dessen findet stets eine geringe Expression der mutierten *HIS3*-Variante statt, sodass auch von *HIS3* wenige „reads“ generiert wurden. Auch anhand der Gene des Galaktosestoffwechsels konnte die Aussagekraft der RNA-Seq-Daten validiert werden. In Abwesenheit von Glukose wird die Expression der zur Metabolisierung von Galaktose nötigen Gene sehr stark induziert (Gancedo 1998). Tatsächlich konnte die Zunahme der Expression in den Genen des Stoffwechsels beobachtet werden. So wurden u.a. sowohl die regulatorischen Gene *GAL4*, *GAL80*, *GAL3*, als auch die Galaktoseverstoffwechelnden Gene *GAL7*, *GAL1* und *GAL10* (Timson 2007) im Verlauf der Induktion hochreguliert. Um eine detailliertere Charakterisierung der durch K28 hoch- und herunterregulierten Gene durchzuführen, wurden mit Hilfe des „GO Slim Mappers“ der „Saccharomyces Genome Database“ (SGD) alle Gene beider Gruppen nach dem zellulären Prozess, an dem sie beteiligt sind, eingeteilt. Das „Gene Ontology“ (GO) Projekt setzt sich zum Ziel, Genprodukte im Hinblick auf ihren biologischen Prozess, zelluläre Lokalisation und molekulare Funktion Spezies-unabhängig zu beschreiben und einzuteilen. Daneben existieren „slimmed“ Versionen, die es möglich machen, Gene auf einer höheren Ebene zu annotieren (Ashburner et al. 2000, Harris et al. 2004). Dies macht die Auswertung einer großen Datenmenge, wie sie bswp. bei Microarray-Analysen oder RNA-Seq auftritt, deutlich übersichtlicher, weswegen auch in diesem Fall der „GO Slim Mapper“ angewendet wurde. Im Falle der 75 durch K28 hochregulierten Gene konnten diese insgesamt 59 zellulären Prozessen zugeordnet werden. Dabei umfasste die größte Gruppe Gene, deren biologische Funktion noch nicht beschrieben ist. Unter den Genen mit bekannter Funktion fand sich keines, dem eine Rolle bei dem K28-induzierten Zellzyklusarrest oder dessen Entgegenwirken bisher zugeschrieben wurde. Es wurden auch keine Gene hochreguliert, die allgemein durch eine Stressreaktion aktiviert werden, wie beispielsweise Hitzeschockproteine oder Komponenten des ERAD-Pathways. Insgesamt gestaltete sich die Interpretation dieser Ergebnisse schwierig. Ein Zusammenhang zwischen der

Hochregulierung der gefundenen Gene und dem K28-induzierten Zellzyklusarrest konnte anhand der vorhandenen Daten nicht erbracht werden. Im Falle der durch K28 herunterregulierten Gene offenbarte sich hingegen ein deutlicher Einfluss des Killertoxins. Im Rahmen der RNA-Seq-Analyse zeigte sich eine K28-anhängige Herunterregulation von 1.237 Genen und somit mehr als 20 % der insgesamt 5.900 erfassten Hefegene. Durch Auswertung der Daten mit Hilfe des „GO Slim Mappers“ konnten die Gene in 99 zelluläre Prozesse eingeteilt werden. Interessanterweise wurde eine Vielzahl an Genen Prozessen zugeordnet, die im Zusammenhang mit der toxischen Wirkung von K28 gebracht wurden, wie beispielsweise RNAPII-abhängige Transkription und Zellzyklus-kontrolle. Interessanterweise waren ebenso viele zelluläre Prozesse betroffen, die direkt oder indirekt an der Translation beteiligt sind, wie z.B. rRNA-Prozessierung, Ribosomen-Biogenese und -Assemblierung sowie die Translation selbst. Auch Carrol *et al.* (2009) fanden heraus, dass eine große Zahl K28-hypersensitiver Mutanten Defekte in Genen tragen, die an der Proteintranslation involviert sind. Die Hemmung der Proteinbiosynthese stellt einen verbreiteten Mechanismus vieler A/B-Toxine wie z.B. Ricin, Shiga- und Diphtherietoxin dar, durch den Zielzellen effektiv abgetötet werden (Sandvig *et al.* 2010). Eine Inhibition der Translation durch K28 α muss in zukünftigen Studien näher untersucht werden. Von der großen Mehrheit der gefundenen Prozesse fehlt ein Bezug zum Wirkmechanismus von K28. Die Daten deuten eher an, dass K28 nicht spezifisch die Transkription von G1/S-Regulatoren, sondern allgemein die RNAPII-abhängige Transkriptionsmaschinerie hemmt, wodurch die Expression einer Vielzahl an Genen unspezifisch gehemmt wird. Um den K28-induzierten Zellzyklusarrest dennoch erklären zu können, wurde untersucht, ob unter den herunterregulierten Genen auch „Targets“ der Transkriptionsfaktoren SBF und MBF zu finden sind. Die Identifizierung und Einteilung der durch SBF und MBF regulierten Gene ist in mehreren Veröffentlichungen dargestellt (Cho *et al.* 1998, Spellman *et al.* 1998, Wittenberg & Reed 2005, Eser 2011). Die detaillierteste und verlässlichste Einordnung ist von Ferrezuelo *et al.* (2010) beschrieben und diente daher als Grundlage zur Auswertung der RNA-Seq-Daten. Insgesamt wird nach Übergang von „Start“ ein transkriptionelles Programm initiiert, durch das mehr als 200 Gene induziert werden. Darunter befinden sich 111 MBF- und 94 SBF-„Targets“ sowie 36 Gene, deren Transkription von beiden Regulatoren aktiviert werden kann (Ferrezuelo *et al.* 2010). Tatsächlich sind unter den durch K28 herunterregulierten Genen 49 MBF- und 45 SBF-reguliert, was in beiden Fällen etwa 50 % entspricht. Aufgrund früherer Ergebnisse wurde postuliert, dass durch K28 spezifisch die Transkription G1/S-relevanter und somit SBF- und MBF-regulierter Gene gehemmt wird. Bei einer spezifischen Hemmung, wäre die Transkription aller SBF- und/oder MBF-„Targets“ gestört. Die Daten aus der Transkriptom-analyse zeigen hingegen, dass dies nicht der Fall ist, da jeweils etwa nur die Hälfte dieser Gen-„Cluster“ in ihrer Expression gehemmt wurde. Dennoch lässt sich

anhand dieser Ergebnisse der K28-induzierte Zellzyklusarrest erklären. Um den Übergang von der G1- zur S-Phase zu stoppen, ist es nicht obligatorisch, dass die Transkription aller SBF- und MBF-regulierten Gene inhibiert wird. Es reicht, wenn wenige essentielle Proteine fehlen, um einen Arrest herbeizuführen. Eine detaillierte Beschreibung aller herunterregulierten SBF- und MBF-„Targets“ würde den Rahmen dieser Diskussion sprengen, weswegen nur auf wenige ausgewählte Gene eingegangen wird. Unter den Genen, deren Transkription gehemmt wurde, befindet sich beispielsweise die essentielle Untereinheit *RNR1* der Ribonukleotid-Reduktase. Dieser tetramere Enzymkomplex katalysiert den Umbau von Nukleotiden zu Desoxynukleotiden, die in der S-Phase zur DNA-Synthese benötigt werden. Eine Inhibierung des Enzyms, z.B. durch Hydroxyurea führt zu einem Zellzyklusarrest (Elledge & Davis 1990). Ebenso sind mit *POL3*, *POL30*, *POL31* und *POL32* mehrere essentielle Gene durch K28 herunterreguliert, die direkt an der DNA-Replikation involviert sind (Kawasaki & Sugino 2001). Fehlen diese Enzyme in der S-Phase, kann keine Replikation der DNA stattfinden und der Zellzyklus arretiert an dieser Stelle. Interessanterweise zeigte auch diese Transkriptomanalyse eine K28-bedingte Abnahme der G1/S-Zykline *CLN1* und *CLN2*, allerdings nicht des G1-Zyklins *CLN3*, womit die Northern-Analysen von Reiter (2004) bestätigt werden konnten. Wie bereits von Reiter postuliert, kann der Zellzyklusarrest auf die Hemmung dieser Zykline zurückgeführt werden. Anhand der Tatsache, dass nicht alle SBF- und MBF-„Target“-Gene durch K28 herunterreguliert wurden, kann auch der terminale Phänotyp Toxin-behandelter Zellen erklärt werden. Möglicherweise werden beispielsweise die zur Initiation der Knospenbildung nötigen Gene nicht herunterreguliert, sodass zwar die Regulatoren der Zellzyklusmaschinerie durch die Transkriptionshemmung betroffen sind, nicht aber die Proteine, die in die Ausbildung der Knospe involviert sind. Insgesamt lässt sich anhand der Daten erklären, wie durch unspezifische Hemmung der Transkription der Zellzyklus an der G1/S-Transition arretiert wird.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen einmal mehr, dass die K28-induzierte Arretierung des Zellzyklus auf einem äußerst komplexen molekularen Mechanismus basiert. Viele Details, z.B. die molekulare Funktion von K28 α , sind noch unbekannt. Durch die Ergebnisse aus dieser Arbeit konnte dennoch das Wissen über den Wirkmechanismus von K28 erweitert werden, sodass diese auch als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen können.

4.3 Modell zur K28-induzierten Hemmung der Transkriptionsmaschinerie

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die bisherigen Erkenntnisse über die Beeinflussung der Transkription durch das Killertoxin K28 deutlich erweitert und ergänzt werden. Durch Interaktion von K28 α mit Komponenten der RNAPII-abhängigen Transkriptionsmaschinerie (Spt15p im Initiations- und Ctr9p im Elongatorkomplex) im Nukleus wird die globale Transkription massiv beeinflusst, so dass mehr als 1.200 Gene herunterreguliert werden. Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass Deletionsmutanten existieren ($\Delta ssn8$, $\Delta ssn2$, $\Delta cse2$, $\Delta sin4$, $\Delta rpb4$, $\Delta rpb9$), die vollständig resistent gegenüber K28 sind. Unter den Genen, deren Expression reprimiert wird, befinden sich viele „Target“-Gene der Transkriptionsfaktoren SBF und MBF. Diese steuern maßgeblich den Übergang von der G1- in die S-Phase. Durch die K28-induzierte Hemmung der Transkription von SBF- und MBF-regulierten Genen kann dieser Übergang nicht stattfinden, wodurch K28-behandelte Zellen ihren Zellzyklus an der G1/S-Transition arretieren (Abbildung 49). Wenige Prozesse, wie beispielsweise die Initiation der Knospenbildung können trotz des Arrests noch initiiert werden. Ob neben der Transkription weitere Mechanismen durch K28 α gehemmt werden, wie z.B. die Degradation des CKI Sic1p, muss in weiteren Studien untersucht werden.

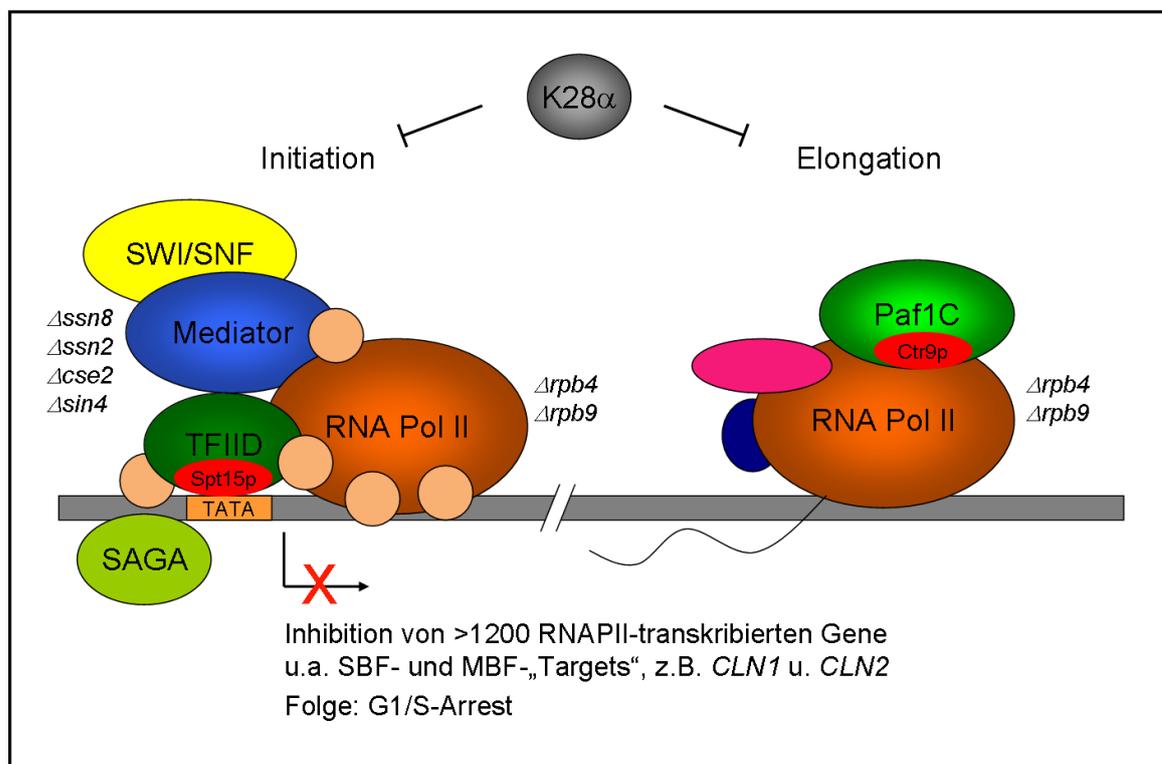


Abbildung 49: Modell zur Hemmung der Transkriptionsmaschinerie durch K28 α . Erläuterungen siehe Text; Schema des Initiations- und Elongationskomplex verändert nach Holstege *et al.* 1998, Pokholok *et al.* 2002, Wen *et al.* 2009

4.4 Ausblick

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen die Verifizierung der terminalen, nukleären Lokalisation von K28 α sowie die Untersuchung des K28-induzierten Zellzyklusarrests. Mit mikroskopischen Methoden war es nicht möglich, einen Kernimport von K28 α zu bestätigen. Dabei muss beachtet werden, dass die angewendeten Methoden *per se* für solch ein Vorhaben grundsätzlich geeignet sind und das Ausbleiben von Signalen von K28 im Hefenukleus auf die verwendeten Antikörper bzw. K28- und K28 α -Varianten zurückzuführen ist. Aus diesem Grund ist es weiterhin sinnvoll, in zukünftigen Experimenten mikroskopische Techniken zum direkten Nachweis von K28 α im Zellkern in Betracht zu ziehen. Als Grundvoraussetzung für einen Antikörper-basierten, mikroskopischen Nachweis mittels IIF oder IEM sollten dafür K28 α -Antikörper zur Verfügung stehen, die hochspezifisch, effizient und ohne das Auftreten von Kreuzreaktionen K28 α detektieren. Als weitere Strategie zum Antikörper-basierten Nachweis von K28 α sollte erneut dessen Fusion mit einem „Tag“ in Betracht gezogen werden. Bei dieser Vorgehensweise könnte die Herstellung K28 α -spezifischer Antikörper vermieden werden, da für die meisten Protein-„Tags“ bereits eine Vielzahl hochspezifischer Antikörper zur Verfügung stehen. Die größte Herausforderung bei dieser Strategie liegt in der Herstellung biologisch aktiver K28-Varianten, die ein „Tag“ an der α -Untereinheit tolerieren. Bisher gelang die Expression eines solchen Toxins nicht. Durch Verwendung bisher nicht genutzter „Tags“ sollte validiert werden, ob dies dennoch möglich ist. Ebenso sollten zusätzlich mehrere Varianten getestet werden, die das „Tag“ an verschiedenen Stellen innerhalb oder angrenzend an die K28 α tragen. Alternativ könnte dieselbe Strategie mit intrazellulär exprimierten präpro α -Varianten weiterhin verfolgt werden. Auch in diesem Fall müsste zunächst sichergestellt werden, dass trotz des angefügten „Tags“ die biologische Aktivität von K28 α nicht verloren geht. Grundsätzlich stellt die Fusion eines Fluoreszenzproteins an ein Testprotein eine elegante Methode für dessen Lokalisationsbestimmung innerhalb einer Zelle dar. Aufgrund des geringen Molekulargewichts von K28 α ist allerdings dessen Fusion mit Fluoreszenzproteinen wie z.B. GFP oder mRFP problematisch, da deren Molekulargewichte das von K28 α weitaus übersteigen, was sich u.a. negativ auf die korrekte Faltung und Lokalisation von K28 α auswirken kann. Abhilfe könnten dabei Systeme leisten, bei denen lediglich eine kurze Peptidsequenz an K28 α fusioniert wird, um so dessen biologische Aktivität zu gewährleisten. Die „Tetracystein-biarsenical-Tag“-Methode stellt ein solches System dar. Dabei wird an das zu untersuchende Protein das Tetracystein-„Tag“ CCPGCC fusioniert und in Hefezellen exprimiert. Zum Nachweis wird auf die Zellen das zellpermeable Fluorophor FIAsH oder ReAsH gegeben, das spezifisch an das Tetracysteinpeptid bindet und anschließend im

Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden kann (Adams *et al.* 2002, Fernandez-Suarez & Ting 2008). Die grundsätzliche Funktionalität des Systems in *S. cerevisiae* wurde bereits beschrieben (Andresen *et al.* 2004). Eine alternative Methode stellt das „Split-GFP Komplementation System“ dar. Dabei wird an das Testprotein ein 15 AS langes Fragment des C-Terminus von GFP fusioniert. Aufgrund der geringen Größe hat das Fragment nur geringe Effekte auf Löslichkeit und Faltung des Testproteins. Das zweite GFP-Fragment wird separat in *E. coli* Zellen exprimiert, aus diesen aufgereinigt und auf die präparierten Testzellen gegeben. Die beiden GFP-Fragmente assoziieren spontan, wodurch Fluoreszenz-aktives GFP gebildet wird, das im Mikroskop detektiert werden kann (Cabantous *et al.* 2005, Cabantous & Waldo 2006, Kaddoum *et al.* 2010). Prinzipiell kann zusätzlich bei allen aufgeführten, fluoreszenzmikroskopischen Methoden die Verwendung eines „Laser-Scanning“-Mikroskops anstelle eines Fluoreszenzmikroskops erwägt werden, um eine definiere Darstellung der subzellulären Lokalisation der Fluoreszenzsignale zu erreichen. Bezüglich des K28-induzierten Zellzyklusarrests bleiben trotz der im Rahmen dieser und früherer Arbeiten gewonnenen Daten noch viele Fragen offen, sodass ein detailliertes Modell der molekularen Wirkungsweise von K28 bisher nicht erstellt werden konnte. Ein Hauptziel bei der Aufklärung des Wirkmechanismus ist die Identifizierung von Interaktionspartnern von K28 α , die möglicherweise dessen „Target“ darstellen. Obwohl bereits durch Y2H-Analysen, TAP-„Tagging“ oder BiFC mehrere potentielle Interaktions-partner gefunden wurden, konnte bisher nur im Falle von Apc2p und Spt15p die Wechselwirkung mit K28 α biochemisch und *in vivo* bestätigt werden. Von großem Nutzen wäre daher die biochemische bzw. *in vivo* Verifizierung der Interaktion von K28 α mit den restlichen und eventuell weiteren potentiellen Interaktionspartnern. Zum experimentellen Nachweis bieten sich auch in diesen Fällen Ko-Immunopräzipitations- und „Pulldown“-Analysen an. Idealerweise sollte dabei K28 α in Hefezellen exprimiert werden, um zu gewährleisten, dass mögliche posttranslationale Modifikationen im ER und Golgi-Apparat durchgeführt werden und K28 α in seiner biologisch aktiven Form eingesetzt wird.

Bei der Suche nach K28-resistenten bzw. -hypersensitiven Deletionsmutanten wurden im Rahmen dieser und früherer Arbeiten mehrere hundert Mutanten getestet. Insgesamt sind etwa 80 % der etwa 6.000 Hefegene nicht essentiell, sodass die K28-Sensitivität der Mehrzahl aller Deletionsmutanten noch unbekannt ist. Es bietet sich hierbei an, weitere Mutanten zu „screenen“ oder mit Hilfe von Mutationsanalysen K28-resistente Zellen zu selektieren. Dabei werden Hefezellen zunächst mutagenisiert und anschließend K28-resistente Mutanten isoliert. Die mTn3-Transposonmutagenese stellt hierfür eine elegante Methode dar und wurde bereits zur Aufklärung der Wirkungsweise des Killertoxins Zymocin erfolgreich angewendet (Frohloff *et al.* 2001). Dabei wird jedes einzelne Hefegen durch ein über homologe Rekombination inseriertes mTn3-Transposon disruptiert. Zellen, die nach der

Mutagenese die letale Wirkung von K28 überleben, werden weiter charakterisiert. Der Integrationsort des Transposons wird bestimmt und das disruptierte Gen mittels Sequenzierung identifiziert (Vidan & Snyder 2001). Die so identifizierten Gene stellen potentielle „Targets“ von K28 α dar und erlauben so eventuelle Rückschlüsse auf den molekularen Mechanismus des K28-induzierten Zellzyklusarrests. Die Selektion sollte über die Expression von K28 α -Letalkonstrukten erfolgen, da bei Toxinzugabe „von außen“ bevorzugt Zellwandmutanten isoliert wurden (Sendzik 2006). Mit dieser Methode wäre es nicht nur möglich, das zelluläre „Target“ von K28 α zu identifizieren, sondern auch weitere intrazelluläre Interaktionspartner von K28 α zu bestimmen, die beispielsweise am retrograden Transport oder der ER-Zytosol-Retrotranslokation beteiligt sind.

Die Proteindegradation stellt einen wichtigen Prozess zur Regulation des Übergangs von der G1- zur S-Phase dar (Verma *et al.* 1997). Um den genauen Zeitpunkt der Toxinwirkung und der daran beteiligten Proteine näher zu charakterisieren, bietet es sich an, die Degradation ausgewählter Proteine bei K28-Einwirkung zu untersuchen. Interessante Regulatoren sind u.a. die G1/S- und S-Zykline, der CKI Sic1p, sowie Cdc6p. Die Akkumulation dieser Regulatoren würde einen Hinweis darauf geben, ob durch K28 die SCF-abhängige Proteolyse gestört ist, wodurch der terminale Phänotyp erklärt werden könnte. Durch Charakterisierung des Abbaus von Cdc6p könnte überprüft werden, ob die DNA-Synthese in der Initiationsphase oder zu einem späteren Zeitpunkt durch K28 gehemmt wird (Toone *et al.* 1997).

Die Strukturbestimmung von K28 und K28 α stellt u.a. den wichtigsten Ansatzpunkt dar, der zur Aufklärung einer Vielzahl an offenen Fragen beitragen könnte. Da bei Proteinen die Struktur immer mit ihrer jeweiligen biologischen Funktion einhergeht, könnte beispielsweise durch Vergleich mit bekannten Strukturen anderer Proteine möglicherweise eine Aussage über die biologische Funktion von K28 α getroffen werden. Es ist denkbar, dass innerhalb des Toxins typische strukturelle Domänen vorhanden sind, denen bereits eine eindeutige molekulare Funktion zugeordnet wurde. So könnten Bindungspartner oder auch Substrate von K28 und K28 α identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Bei K28 handelt es sich um ein A/B-Toxin, das von *S. cerevisiae* Zellen, die mit dem M28-Virus infiziert sind, sezerniert wird und sensitive Hefezellen abtötet. Neben Apoptose, die durch sehr geringe Toxinmengen induziert wird, basiert der Abtötungsmechanismus auf einer Arretierung des Zellzyklus am Übergang von der G1- zur S-Phase und einer irreversiblen Hemmung der DNA-Synthese. Die Aufnahme des Toxins beruht auf einem zweistufigen Prozess, bei dem zunächst das Toxin an den Primärrezeptor in der Zellwand bindet und von dort auf den Sekundärrezeptor in der Plasmamembran transloziert. Nach endozytotischer Aufnahme durchläuft das Toxin retrograd den Sekretionsweg über Golgi-Apparat und ER, aus dem es in das Zytoplasma retrotransloziert und schließlich in seine Untereinheiten α und β zerfällt. Die β -Untereinheit wird nach Ubiquitinierung proteasomal degradiert, wohingegen $K28\alpha$ in den Nukleus gelangt und dort seine toxische Wirkung entfaltet. Trotz intensiver Bemühungen waren sowohl der Kernimport von $K28\alpha$, als auch die molekulare Grundlage des K28-induzierten Zellzyklusarrests nicht vollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurden daher zum einen die terminale, nukleäre Lokalisation von $K28\alpha$ validiert und zum anderen der molekulare Mechanismus der Zellzyklusarretierung näher untersucht.

In Bezug auf die nukleäre Lokalisation von $K28\alpha$ konnten die bereits vorhandenen indirekten Hinweise auf einen Kernimport bestätigt und die Kenntnisse darüber erweitert werden. Durch einen forcierten Kernexport, der durch N-terminale Fusion einer Kernexportsequenz an $K28\alpha$ erreicht wurde, konnte die toxische Wirkung eines $K28\alpha$ -Letalkonstrukts vollständig aufgehoben werden, wodurch verdeutlicht wurde, dass die Lokalisation von $K28\alpha$ im Zellkern für dessen toxische Wirkung obligatorisch ist.

Die nukleäre Lokalisation von $K28\alpha$ wurde zudem mit Hilfe mikroskopischer Techniken untersucht. Dabei wurde zunächst versucht, mit Hilfe von Fusionen aus dem Fluoreszenzprotein mRFP und $K28\alpha$, den Nachweis des Kernimports von $K28\alpha$ in lebenden Hefezellen zu erreichen. Erstaunlicherweise zeigten die konstruierten Fusionsproteine eine deutliche Fehllokalisierung in der Kernmembran und im peripheren ER, weswegen ein *in vivo* Nachweis von $K28\alpha$ im Hefezellkern nicht erbracht werden konnte.

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie stellte eine weitere Technik dar, mit der versucht wurde, $K28\alpha$ im Nukleus zu detektieren. Dazu wurden Zellen oder Sphäroplasten verwendet, die entweder mit K28-Toxin behandelt wurden oder ein $K28\alpha$ -Letalkonstrukt exprimierten. Des Weiteren wurden K28-resistente Mutanten verwendet, um bei intrazellulärer Expression die Menge an Toxinmolekülen zu erhöhen. Trotz der vielfältigen Versuchsansätze und der Verwendung verschiedener K28- bzw. $K28\alpha$ -Antikörper gelang der Nachweis von $K28\alpha$

innerhalb des Zellkerns mit diesen Methoden nicht. Grund dafür waren starke Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper, durch welche eventuelle Signale von K28 α überdeckt wurden.

Die nukleäre Lokalisation von K28 α wurde darüber hinaus mit Hilfe der Immunogold-Elektronenmikroskopie analysiert. Hierzu wurden Hefen eingesetzt, die eine K28 α -Variante mit V5-„Tag“ intrazellulär exprimierten. Insgesamt zeigten nur sehr wenige Zellen Signale der Goldpartikel im TEM, wodurch eine korrekte und statistisch abgesicherte Auswertung der Daten nicht möglich war. Die wenigen vorhandenen Signale deuteten jedoch auf eine Lokalisierung innerhalb der Kernmembran hin. Der zusätzliche Versuch, endozytotisch internalisiertes Toxin mittels IEM innerhalb der Hefezellen zu detektieren misslang, da aufgrund der zu geringen endozytierten Toxinmenge keine Signale nachweisbar waren.

Im Rahmen der Untersuchungen des K28-induzierten Zellzyklusarrests konnten mit Hilfe der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementationsanalyse eine Interaktion zwischen K28 α und den Proteinen Spt15p und Apc2p bestätigt werden. Die bereits bekannte genetische Interaktion wurde somit *in vivo* verifiziert.

Die Untersuchung von Hefemutanten mit Deletionen in ausgesuchten Genen lieferte interessante Einblicke in die Wirkungsweise von K28. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass sich der Wirkungsmechanismus von K28 von dem der beiden anderen Zellzyklus-arretierenden Killertoxine PaT und Zymocin unterscheidet. K28 stellt demnach ein Killertoxin mit einem bisher einzigartigen Abtötungsmechanismus dar. Weitere Untersuchungen offenbarten eine deutliche Anzahl an resistenten Mutanten, bei denen Gene der RNAII-abhängigen Transkriptionsmaschinerie deletiert waren, u.a. Mutanten mit Deletionen von Untereinheiten der RNAPII selbst sowie des Mediators. Die Ergebnisse unterstreichen die Hypothese, dass die Transkriptionsmaschinerie einen Angriffspunkt von K28 α darstellt.

Mit Hilfe von Überexpressionstudien wurde der K28-induzierte Zellzyklusarrest näher charakterisiert. Dabei wurden ausgesuchte Regulatoren der Transition von der G1- zur S-Phase überexprimiert. Insgesamt war in vielen Fällen die Vitalität der Zellen bereits aufgrund der Überexpression herabgesetzt, wodurch keine sicheren Aussagen getroffen werden konnten. Dennoch deuten die Ergebnisse an, dass sowohl bei einer direkten oder indirekten Überexpression des Zyklins Cln2p, als auch bei einer forcierten Degradation des CKI Sic1p die Sensitivität der Zellen gegen K28 deutlich sinkt.

Aufgrund der Vermutung, dass K28 die RNAPII-abhängige Transkriptionsmaschinerie hemmt, wurde eine globale Transkriptomanalyse mittels RNA-Seq durchgeführt und die differentielle Genexpression in Toxin-behandelten und unbehandelten Zellen verglichen. Es zeigte sich eine unspezifische Hemmung der Transkription von mehr als 1.200 Genen. Betroffen waren dabei viele Gene, die den Übergang von der G1- zur S-Phase regulieren,

sodass ein Zusammenhang zwischen der Transkriptionshibierung und dem K28-induzierten Zellzyklusarrest hergestellt werden konnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Erkenntnisse über den Kernimport von K28 α und den K28-induzierten Zellzyklusarrest vertieft und dadurch das Verständnis über die molekulare Wirkungsweise von K28 erweitert. Wenngleich der exakte Mechanismus der Zellzyklusarretierung auf molekularer Ebene nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, so wurden durch die vorliegende Arbeit wichtige Daten gewonnen, die zu dessen Aufklärung beitragen und weiterführende Untersuchungen nahelegen.

6 Literatur

- Ackermann, K., Waxmann, A., Glover, C. V. & Pyerin, W. (2001) Genes targeted by protein kinase CK2: a genome-wide expression array analysis in yeast. *Mol Cell Biochem*, **227**, 59-66.
- Adachi, M., Fukuda, M. & Nishida, E. (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *Embo J*, **18**, 5347-5358.
- Adams, S. R., Campbell, R. E., Gross, L. A., Martin, B. R., Walkup, G. K., Yao, Y., Llopis, J. et al. (2002) New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling *in vitro* and *in vivo*: synthesis and biological applications. *J Am Chem Soc*, **124**, 6063-6076.
- Aitchison, J. D., Blobel, G. & Rout, M. P. (1995) Nup120p: a yeast nucleoporin required for NPC distribution and mRNA transport. *J Cell Biol*, **131**, 1659-1675.
- Allen, A., Islamovic, E., Kaur, J., Gold, S., Shah, D. & Smith, T. J. (2011) Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut. *Plant Biotechnol J*, **9**, 857-864.
- Andresen, M., Schmitz-Salue, R. & Jakobs, S. (2004) Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the significance of small labels for live cell imaging. *Mol Biol Cell*, **15**, 5616-5622.
- Andrews, B. & Measday, V. (1998) The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea. *Trends Genet*, **14**, 66-72.
- Armache, K. J., Kettenberger, H. & Cramer, P. (2005) The dynamic machinery of mRNA elongation. *Curr Opin Struct Biol*, **15**, 197-203.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P. et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, **25**, 25-29.
- Bakhrat, A., Baranes, K., Krichevsky, O., Rom, I., Schlenstedt, G., Pietrokovski, S. & Raveh, D. (2006) Nuclear import of ho endonuclease utilizes two nuclear localization signals and four importins of the ribosomal import system. *J Biol Chem*, **281**, 12218-12226.
- Bandhakavi, S., McCann, R. O., Hanna, D. E. & Glover, C. V. (2003) Genetic interactions among ZDS1,2, CDC37, and protein kinase CK2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **554**, 295-300.
- Barberis, M., Pagano, M. A., Gioia, L. D., Marin, O., Vanoni, M., Pinna, L. A. & Alberghina, L. (2005) CK2 regulates *in vitro* the activity of the yeast cyclin-dependent kinase inhibitor Sic1. *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 1040-1048.
- Bardin, A. J. & Amon, A. (2001) Men and sin: what's the difference? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 815-826.
- Barford, D. (2011) Structure, function and mechanism of the anaphase promoting complex (APC/C). *Q Rev Biophys*, **44**, 153-190.
- Barnard, E., McFerran, N. V., Nelson, J. & J., T. D. (2007) Detection of Protein-Protein Interactions Using Protein-Fragment Complementation Assays (PCA). *Current Proteomics*, **4**, 17-27.
- Barral, Y., Jentsch, S. & Mann, C. (1995) G1 cyclin turnover and nutrient uptake are controlled by a common pathway in yeast. *Genes Dev*, **9**, 399-409.
- Barz, T., Ackermann, K., Dubois, G., Eils, R. & Pyerin, W. (2003) Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. *J Cell Sci*, **116**, 1563-1577.
- Bayliss, R., Ribbeck, K., Akin, D., Kent, H. M., Feldherr, C. M., Gorlich, D. & Stewart, M. (1999) Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *J Mol Biol*, **293**, 579-593.
- Bean, J. M., Siggia, E. D. & Cross, F. R. (2005) High functional overlap between Mlul cell-cycle box binding factor and Swi4/6 cell-cycle box binding factor in the G1/S transcriptional program in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **171**, 49-61.

- Becker, B. & Schmitt, M. J. (2011)** Adapting yeast as model to study ricin toxin uptake and trafficking. *Toxins (Basel)*, **3**, 834-847.
- Betz, J. L., Chang, M., Washburn, T. M., Porter, S. E., Mueller, C. L. & Jaehning, J. A. (2002)** Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol Genet Genomics*, **268**, 272-285.
- Bevan, E. A. & Makower, M. (1963)** The physiological basis of the killer character in yeast. In *Proc XIth Int Congr Genet*, pp. 202-203.
- Bhoite, L. T., Yu, Y. & Stillman, D. J. (2001)** The Swi5 activator recruits the Mediator complex to the HO promoter without RNA polymerase II. *Genes Dev*, **15**, 2457-2469.
- Binder, M., Hartig, A. & Sata, T. (1996)** Immunogold labeling of yeast cells: an efficient tool for the study of protein targeting and morphological alterations due to overexpression and inactivation of genes. *Histochem Cell Biol*, **106**, 115-130.
- Birnboim, H. C. (1983)** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*, **100**, 243-255.
- Bjorklund, S. & Gustafsson, C. M. (2005)** The yeast Mediator complex and its regulation. *Trends Biochem Sci*, **30**, 240-244.
- Bleve, G., Zacheo, G., Cappello, M. S., Dellaglio, F. & Grieco, F. (2005)** Subcellular localization and functional expression of the glycerol uptake protein 1 (GUP1) of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with green fluorescent protein. *Biochem J*, **390**, 145-155.
- Bloom, J. & Cross, F. R. (2007)** Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 149-160.
- Boone, C., Sdicu, A.-M., Wagner, J., Degré, R., Sanchez, H. & Bussey, H. (1990)** Integration of the Yeast K1 Killer Toxin Gene into the Genome of Marked Wine Yeasts and Its Effect on Vinification. *Am. J. Enol. Vitic*, **41**, 37-42.
- Bordonné, R. (2000)** Functional characterization of nuclear localization signals in yeast Sm proteins. *Mol Cell Biol*, **20**, 7943-7954.
- Bostian, K. A., Hopper, J. E., Rogers, D. T. & Tipper, D. J. (1980)** Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell*, **19**, 403-414.
- Botstein, D., Chervitz, S. A. & Cherry, J. M. (1997)** Yeast as a model organism. *Science*, **277**, 1259-1260.
- Bouquin, N., Barral, Y., Courbeyrette, R., Blondel, M., Snyder, M. & Mann, C. (2000)** Regulation of cytokinesis by the Elm1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **113** (Pt 8), 1435-1445.
- Bouquin, N., Johnson, A. L., Morgan, B. A. & Johnston, L. H. (1999)** Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell*, **10**, 3389-3400.
- Bourbonnais, Y., Faucher, N., Pallotta, D. & Larouche, C. (2001)** Multiple cellular processes affected by the absence of the Rpb4 subunit of RNA polymerase II contribute to the deficiency in the stress response of the yeast *rpb4(delta)* mutant. *Mol Gen Genet*, **264**, 763-772.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S. & Ohad, N. (2004)** Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J*, **40**, 419-427.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. & Boeke, J. D. (1998)** Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.
- Breeuwer, M. & Goldfarb, D. S. (1990)** Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell*, **60**, 999-1008.
- Breinig, F., Sendzik, T., Einfeld, K. & Schmitt, M. J. (2006)** Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 3810-3815.

- Buck, C. (2012)** Biochemische Interaktionsstudien zur Protein/Protein-Wechselwirkung zwischen der α -Untereinheit des viralen Killertoxins K28 und den Hefeproteinen Spt15p, Ctr9p und Cka2p. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Burley, S. K. & Roeder, R. G. (1996)** Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem*, **65**, 769-799.
- Burnette, W. N. (1981)** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- Bussey, H. (1991)** K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol Microbiol*, **5**, 2339-2343.
- Bussey, H., Saville, D., Hutchins, K. & Palfree, R. G. (1979)** Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **140**, 888-892.
- Bussey, H. & Skipper, N. (1975)** Membrane-mediated killing of *Saccharomyces cerevisiae* by glycoproteins from *Torulopsis glabrata*. *J Bacteriol*, **124**, 476-483.
- Büttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G. & Madeo, F. (2006)** Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. *J Cell Biol*, **175**, 521-525.
- Byers, B. (1981)** *Cytology of the yeast life cycle*: NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cabantous, S., Pedelacq, J. D., Mark, B. L., Naranjo, C., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. (2005)** Recent advances in GFP folding reporter and split-GFP solubility reporter technologies. Application to improving the folding and solubility of recalcitrant proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Struct Funct Genomics*, **6**, 113-119.
- Cabantous, S., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. (2005)** Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, **23**, 102-107.
- Cabantous, S. & Waldo, G. S. (2006)** *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. *Nat Methods*, **3**, 845-854.
- Cai, G., Imasaki, T., Yamada, K., Cardelli, F., Takagi, Y. & Asturias, F. J. (2011)** Mediator head module structure and functional interactions. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 273-279.
- Cairns, B. R., Lorich, Y., Li, Y., Zhang, M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et al. (1996)** RSC, an essential, abundant chromatin-remodeling complex. *Cell*, **87**, 1249-1260.
- Calvin, N. M. & Hanawalt, P. C. (1988)** High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*, **170**, 2796-2801.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. (2002)** A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7877-7882.
- Cao, Y., Cairns, B. R., Kornberg, R. D. & Laurent, B. C. (1997)** Sfh1p, a component of a novel chromatin-remodeling complex, is required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **17**, 3323-3334.
- Cappel, S. (2006)** Untersuchungen zur rezeptorvermittelten Endozytose und zum retrograden Toxintransport am Beispiel eines viralen A/B Toxins der Hefe. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Carroll, S. Y., Stirling, P. C., Stimpson, H. E., Giesselmann, E., Schmitt, M. J. & Drubin, D. G. (2009)** A yeast killer toxin screen provides insights into a/b toxin entry, trafficking, and killing mechanisms. *Dev Cell*, **17**, 552-560.
- Caston, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S. & Steven, A. C. (1997)** Structure of L-A virus: a specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol*, **138**, 975-985.
- Chang, E. J., Begum, R., Chait, B. T. & Gaasterland, T. (2007)** Prediction of cyclin-dependent kinase phosphorylation substrates. *PLoS One*, **2**, e656.
- Charvin, G., Oikonomou, C., Siggia, E. D. & Cross, F. R. (2010)** Origin of irreversibility of cell cycle start in budding yeast. *PLoS Biol*, **8**, e1000284.
- Chen, B., Choi, G. H. & Nuss, D. L. (1994)** Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. *Science*, **264**, 1762-1764.

- Cho, R. J., Campbell, M. J., Winzler, E. A., Steinmetz, L., Conway, A., Wodicka, L., Wolfsberg, T. G. *et al.* (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell*, **2**, 65-73.
- Choder, M. & Young, R. A. (1993) A portion of RNA polymerase II molecules has a component essential for stress responses and stress survival. *Mol Cell Biol*, **13**, 6984-6991.
- Chu, Y., Simic, R., Warner, M. H., Arndt, K. M. & Prelich, G. (2007) Regulation of histone modification and cryptic transcription by the Bur1 and Paf1 complexes. *Embo J*, **26**, 4646-4656.
- Cocchetti, P., Rossi, R. L., Sternieri, F., Porro, D., Russo, G. L., di Fonzo, A., Magni, F. *et al.* (2004) Mutations of the CK2 phosphorylation site of Sic1 affect cell size and S-Cdk kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **51**, 447-460.
- Cocchetti, P., Zinzalla, V., Tedeschi, G., Russo, G. L., Fantinato, S., Marin, O., Pinna, L. A. *et al.* (2006) Sic1 is phosphorylated by CK2 on Ser201 in budding yeast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **346**, 786-793.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M. & Conti, E. (2007) Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem*, **76**, 647-671.
- Cosma, M. P., Panizza, S. & Nasmyth, K. (2001) Cdk1 triggers association of RNA polymerase to cell cycle promoters only after recruitment of the mediator by SBF. *Mol Cell*, **7**, 1213-1220.
- Cosma, M. P., Tanaka, T. & Nasmyth, K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell*, **97**, 299-311.
- Costanzo, M., Nishikawa, J. L., Tang, X., Millman, J. S., Schub, O., Breitkreuz, K., Dewar, D. *et al.* (2004) CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, **117**, 899-913.
- Costanzo, M., Schub, O. & Andrews, B. (2003) G1 transcription factors are differentially regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by the Swi6-binding protein Stb1. *Mol Cell Biol*, **23**, 5064-5077.
- Cross, F. R. (1988) DAF1, a mutant gene affecting size control, pheromone arrest, and cell cycle kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **8**, 4675-4684.
- Daley, J. M., Palmbo, P. L., Wu, D. & Wilson, T. E. (2005) Nonhomologous end joining in yeast. *Annu Rev Genet*, **39**, 431-451.
- Daniel, J. A., Yoo, J., Bettinger, B. T., Amberg, D. C. & Burke, D. J. (2006) Eliminating gene conversion improves high-throughput genetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **172**, 709-711.
- Dausend, J. (2010) *In vivo* Topologie und Lokalisation des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p und dessen Funktion bei der Endozytose des viralen K28-Toxins in Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- de Bruin, R. A., McDonald, W. H., Kalashnikova, T. I., Yates, J., 3rd & Wittenberg, C. (2004) Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. *Cell*, **117**, 887-898.
- de Nadal, E., Ammerer, G. & Posas, F. (2011) Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet*, **12**, 833-845.
- Deng, M. & Hochstrasser, M. (2006) Spatially regulated ubiquitin ligation by an ER/nuclear membrane ligase. *Nature*, **443**, 827-831.
- DeSalle, L. M. & Pagano, M. (2001) Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett*, **490**, 179-189.
- Di Como, C. J., Chang, H. & Arndt, K. T. (1995) Activation of CLN1 and CLN2 G1 cyclin gene expression by BCK2. *Mol Cell Biol*, **15**, 1835-1846.
- Dignard, D., Whiteway, M., Germain, D., Tessier, D. & Thomas, D. Y. (1991) Expression in yeast of a cDNA copy of the K2 killer toxin gene. *Mol Gen Genet*, **227**, 127-136.
- Dirick, L., Bohm, T. & Nasmyth, K. (1995) Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **14**, 4803-4813.

- Dmochowska, A., Dignard, D., Henning, D., Thomas, D. Y. & Bussey, H. (1987) Yeast KEX1 gene encodes a putative protease with a carboxypeptidase B-like function involved in killer toxin and alpha-factor precursor processing. *Cell*, **50**, 573-584.
- Doi, A. & Doi, K. (1982) Progress in the mitotic cycle of yeast spheroplasts in liquid culture. *Exp Cell Res*, **137**, 95-110.
- Dotson, M. R., Yuan, C. X., Roeder, R. G., Myers, L. C., Gustafsson, C. M., Jiang, Y. W., Li, Y. et al. (2000) Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14307-14310.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Drury, L. S., Perkins, G. & Diffley, J. F. (1997) The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. *Embo J*, **16**, 5966-5976.
- Du, J., Nasir, I., Benton, B. K., Kladde, M. P. & Laurent, B. C. (1998) Sth1p, a *Saccharomyces cerevisiae* Snf2p/Swi2p homolog, is an essential ATPase in RSC and differs from Snf/Swi in its interactions with histones and chromatin-associated proteins. *Genetics*, **150**, 987-1005.
- Edgington, N. P. & Futcher, B. (2001) Relationship between the function and the location of G1 cyclins in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci*, **114**, 4599-4611.
- Eiden-Plach, A., Zagorc, T., Heintel, T., Carius, Y., Breinig, F. & Schmitt, M. J. (2004) Viral preprotoxin signal sequence allows efficient secretion of green fluorescent protein by *Candida glabrata*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 961-966.
- Eisfeld, K. (2001) Endozytose und retrograder Proteintransport am Beispiel des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Eisfeld, K., Riffer, F., Mentges, J. & Schmitt, M. J. (2000) Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol Microbiol*, **37**, 926-940.
- Elsasser, S., Chi, Y., Yang, P. & Campbell, J. L. (1999) Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis. *Mol Biol Cell*, **10**, 3263-3277.
- Enserink, J. M. & Kolodner, R. D. (2010) An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div*, **5**, 11.
- Epstein, C. B. & Cross, F. R. (1992) CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev*, **6**, 1695-1706.
- Epstein, C. B. & Cross, F. R. (1994) Genes that can bypass the CLN requirement for *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle START. *Mol Cell Biol*, **14**, 2041-2047.
- Escote, X., Zapater, M., Clotet, J. & Posas, F. (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol*, **6**, 997-1002.
- Eser, U., Falleur-Fettig, M., Johnson, A. & Skotheim, J. M. (2011) Commitment to a cellular transition precedes genome-wide transcriptional change. *Mol Cell*, **43**, 515-527.
- Espinoza, F. H., Ogas, J., Herskowitz, I. & Morgan, D. O. (1994) Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science*, **266**, 1388-1391.
- Esteban, R. & Wickner, R. B. (1986) Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: *in vitro* M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol Cell Biol*, **6**, 1552-1561.
- Fahrenkrog, B., Hurt, E. C., Aebi, U. & Panté, N. (1998) Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes. *J Cell Biol*, **143**, 577-588.
- Falnes, P. O. & Sandvig, K. (2000) Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 407-413.
- Fan, J. Y., Cui, Z. Q., Wei, H. P., Zhang, Z. P., Zhou, Y. F., Wang, Y. P. & Zhang, X. E. (2008) Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **367**, 47-53.
- Feldman, R. M., Correll, C. C., Kaplan, K. B. & Deshaies, R. J. (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell*, **91**, 221-230.

- Fernandez-Suarez, M. & Ting, A. Y. (2008)** Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 929-943.
- Ferrezuelo, F., Aldea, M. & Futcher, B. (2009)** Bck2 is a phase-independent activator of cell cycle-regulated genes in yeast. *Cell Cycle*, **8**, 239-252.
- Ferrezuelo, F., Colomina, N., Futcher, B. & Aldea, M. (2010)** The transcriptional network activated by Cln3 cyclin at the G1-to-S transition of the yeast cell cycle. *Genome Biol*, **11**, R67.
- Flick, K., Chapman-Shimshoni, D., Stuart, D., Guaderrama, M. & Wittenberg, C. (1998)** Regulation of cell size by glucose is exerted via repression of the CLN1 promoter. *Mol Cell Biol*, **18**, 2492-2501.
- Fried, H. & Kutay, U. (2003)** Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 1659-1688.
- Frohloff, F., Fichtner, L., Jablonowski, D., Breunig, K. D. & Schaffrath, R. (2001)** *Saccharomyces cerevisiae* Elongator mutations confer resistance to the *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Embo J*, **20**, 1993-2003.
- Futcher, B. (1996)** Cyclins and the wiring of the yeast cell cycle. *Yeast*, **12**, 1635-1646.
- Galy, V., Olivo-Marin, J. C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N. & Nehrbass, U. (2000)** Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, **403**, 108-112.
- Gancedo, J. M. (1998)** Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 334-361.
- Ganem, C., Miled, C., Facca, C., Valay, J. G., Labesse, G., Ben Hassine, S., Mann, C. et al. (2006)** Kinase Cak1 functionally interacts with the PAF1 complex and phosphatase Ssu72 via kinases Ctk1 and Bur1. *Mol Genet Genomics*, **275**, 136-147.
- Gardner, R., Cronin, S., Leader, B., Rine, J. & Hampton, R. (1998)** Sequence determinants for regulated degradation of yeast 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, an integral endoplasmic reticulum membrane protein. *Mol Biol Cell*, **9**, 2611-2626.
- Gießelmann, E. (2007)** Analyse der *in vivo* Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Gießelmann, E. (2011)** Endozytose und intrazellulärer Toxintransport in Hefe- und Säugerzellen mittels fluoreszenzmarkierter K28-Varianten. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Glover, C. V., 3rd (1998)** On the physiological role of casein kinase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **59**, 95-133.
- Glover, C. V., Bidwai, A. P. & Reed, J. C. (1994)** Structure and function of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II. *Cell Mol Biol Res*, **40**, 481-488.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F. et al. (1996)** Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-547.
- Goodrich, J. A. & Tjian, R. (1994)** TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 403-409.
- Görlich, D. & Kutay, U. (1999)** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 607-660.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X. et al. (2011)** Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, **29**, 644-652.
- Green, M. R. (2000)** TBP-associated factors (TAFs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem Sci*, **25**, 59-63.
- Griffith, J., Mari, M., De Maziere, A. & Reggiori, F. (2008)** A cryosectioning procedure for the ultrastructural analysis and the immunogold labelling of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic*, **9**, 1060-1072.
- Griffith, J. & Reggiori, F. (2009)** Ultrastructural analysis of nanogold-labeled endocytic compartments of yeast *Saccharomyces cerevisiae* using a cryosectioning procedure. *J Histochem Cytochem*, **57**, 801-809.
- Guida, A., Lindstadt, C., Maguire, S. L., Ding, C., Higgins, D. G., Corton, N. J., Berriman, M. et al. (2011)** Using RNA-seq to determine the transcriptional landscape and the

- hypoxic response of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *BMC Genomics*, **12**, 628.
- Guida, L. (2007)** Sekretion und affinitätschromatographische Reinigung von FLAG- und His-markierten Toxinvarianten von K28 in den Hefen *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F. & Sakaguchi, K. (1981)** Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol*, **145**, 382-390.
- Gustafsson, C. M., Myers, L. C., Beve, J., Spahr, H., Lui, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. et al. (1998)** Identification of new mediator subunits in the RNA polymerase II holoenzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 30851-30854.
- Guttinger, S., Laurell, E. & Kutay, U. (2009)** Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 178-191.
- Hahn, S., Maurer, P., Caesar, S. & Schlenstedt, G. (2008)** Classical NLS proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, **379**, 678-694.
- Hanna, D. E., Rethinaswamy, A. & Glover, C. V. (1995)** Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **270**, 25905-25914.
- Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., Eilbeck, K. et al. (2004)** The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res*, **32**, D258-261.
- Hartwell, L. H. (1974)** *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol Rev*, **38**, 164-198.
- Hautbergue, G. & Goguel, V. (1999)** The yeast C-type cyclin Ctk2p is phosphorylated and rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol*, **19**, 2527-2534.
- Hayman, G. T. & Bolen, P. L. (1991)** Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. *Curr Genet*, **19**, 389-393.
- Heath, C. V., Copeland, C. S., Amberg, D. C., Del Priore, V., Snyder, M. & Cole, C. N. (1995)** Nuclear pore complex clustering and nuclear accumulation of poly(A)⁺ RNA associated with mutation of the *Saccharomyces cerevisiae* RAT2/NUP120 gene. *J Cell Biol*, **131**, 1677-1697.
- Heiligenstein, S., Eisfeld, K., Sendzik, T., Jimenez-Becker, N., Breinig, F. & Schmitt, M. J. (2006)** Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. *Embo J*, **25**, 4717-4727.
- Heintel, T., Zagorc, T. & Schmitt, M. J. (2001)** Expression, processing and high level secretion of a virus toxin in fission yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*, **56**, 165-172.
- Hemming, S. A. & Edwards, A. M. (2000)** Yeast RNA polymerase II subunit RPB9. Mapping of domains required for transcription elongation. *J Biol Chem*, **275**, 2288-2294.
- Hemming, S. A., Jansma, D. B., Macgregor, P. F., Goryachev, A., Friesen, J. D. & Edwards, A. M. (2000)** RNA polymerase II subunit Rpb9 regulates transcription elongation *in vivo*. *J Biol Chem*, **275**, 35506-35511.
- Hodge, C. A., Colot, H. V., Stafford, P. & Cole, C. N. (1999)** Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *Embo J*, **18**, 5778-5788.
- Hodgson, V. J., Walker, G. M. & Button, D. (1994)** A rapid colorimetric assay of killer toxin activity in yeast. *FEMS Microbiol Lett*, **120**, 201-205.
- Hoelz, A., Debler, E. W. & Blobel, G. (2011)** The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem*, **80**, 613-643.
- Hoff, B. & Kuck, U. (2005)** Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet*, **47**, 132-138.
- Holstege, F. C., Jennings, E. G., Wyrick, J. J., Lee, T. I., Hengartner, C. J., Green, M. R., Golub, T. R. et al. (1998)** Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*, **95**, 717-728.
- Hontz, J. S., Villar-Lecumberri, M. T., Dreyfus, L. A. & Yoder, M. D. (2006)** Crystallization of *Escherichia coli* CdtB, the biologically active subunit of cytolethal distending toxin. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, **62**, 192-195.

- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-68.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. & Kerppola, T. K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, **9**, 789-798.
- Huang, B., Johansson, M. J. & Bystrom, A. S. (2005) An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *Rna*, **11**, 424-436.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. & O'Shea, E. K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686-691.
- Hull, M. W., McKune, K. & Woychik, N. A. (1995) RNA polymerase II subunit RPB9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev*, **9**, 481-490.
- Hutchins, K. & Bussey, H. (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J Bacteriol*, **154**, 161-169.
- Icho, T. & Wickner, R. B. (1989) The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J Biol Chem*, **264**, 6716-6723.
- Ide, G. J. & Saunders, C. A. (1981) Rapid Isolation of Yeast Nuclei. *Curr Genet*, **4**, 85-90.
- Iovine, M. K. & Wente, S. R. (1997) A nuclear export signal in Kap95p is required for both recycling the import factor and interaction with the nucleoporin GLFG repeat regions of Nup116p and Nup100p. *J Cell Biol*, **137**, 797-811.
- Irniger, S. (2002) Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS Lett*, **532**, 7-11.
- Ivanovska, I. & Hardwick, J. M. (2005) Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. *J Cell Biol*, **170**, 391-399.
- Jablonowski, D., Frohloff, F., Fichtner, L., Stark, M. J. & Schaffrath, R. (2001) *Kluyveromyces lactis* zymocin mode of action is linked to RNA polymerase II function via Elongator. *Mol Microbiol*, **42**, 1095-1105.
- Jablonowski, D. & Schaffrath, R. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II is affected by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *J Biol Chem*, **277**, 26276-26280.
- Jablonowski, D. & Schaffrath, R. (2007) Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1533-1537.
- Jablonowski, D., Zink, S., Mehlgarten, C., Daum, G. & Schaffrath, R. (2006) tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast. *Mol Microbiol*, **59**, 677-688.
- Jaehning, J. A. (2010) The Paf1 complex: platform or player in RNA polymerase II transcription? *Biochim Biophys Acta*, **1799**, 379-388.
- Kaddoum, L., Magdeleine, E., Waldo, G. S., Joly, E. & Cabantous, S. (2010) One-step split GFP staining for sensitive protein detection and localization in mammalian cells. *Biotechniques*, **49**, 727-728, 730, 732 passim.
- Kelkel, M. (2009) Untersuchungen zum zellulären Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation einer cytotoxischen α -Variante des viralen A/B-Toxins K28 der Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Keminer, O. & Peters, R. (1999) Permeability of single nuclear pores. *Biophys J*, **77**, 217-228.
- Kenna, M. A., Brachmann, C. B., Devine, S. E. & Boeke, J. D. (1998) Invading the yeast nucleus: a nuclear localization signal at the C terminus of Ty1 integrase is required for transposition *in vivo*. *Mol Cell Biol*, **18**, 1115-1124.
- Keogh, M. C., Podolny, V. & Buratowski, S. (2003) Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **23**, 7005-7018.
- Kerppola, T. K. (2006) Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc*, **1**, 1278-1286.

- Khadaroo, B., Teixeira, M. T., Luciano, P., Eckert-Boulet, N., Germann, S. M., Simon, M. N., Gallina, I. et al. (2009)** The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. *Nat Cell Biol*, **11**, 980-987.
- Kinal, H., Park, C. M., Berry, J. O., Koltin, Y. & Bruenn, J. A. (1995)** Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell*, **7**, 677-688.
- Kitamoto, H. K., Jablonowski, D., Nagase, J. & Schaffrath, R. (2002)** Defects in yeast RNA polymerase II transcription elicit hypersensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Genet Genomics*, **268**, 49-55.
- Klassen, R., Krampe, S. & Meinhardt, F. (2007)** Homologous recombination and the yKu70/80 complex exert opposite roles in resistance against the killer toxin from *Pichia acaciae*. *DNA Repair (Amst)*, **6**, 1864-1875.
- Klassen, R. & Meinhardt, F. (2005)** Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiol*, **7**, 393-401.
- Klassen, R., Paluszynski, J. P., Wemhoff, S., Pfeiffer, A., Fricke, J. & Meinhardt, F. (2008)** The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA(Gln). *Mol Microbiol*, **69**, 681-697.
- Klassen, R., Teichert, S. & Meinhardt, F. (2004)** Novel yeast killer toxins provoke S-phase arrest and DNA damage checkpoint activation. *Mol Microbiol*, **53**, 263-273.
- Klassen, R., Wemhoff, S., Krause, J. & Meinhardt, F. (2011)** DNA repair defects sensitize cells to anticodon nuclease yeast killer toxins. *Mol Genet Genomics*, **285**, 185-195.
- Koch, C., Moll, T., Neuberg, M., Ahorn, H. & Nasmyth, K. (1993)** A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. *Science*, **261**, 1551-1557.
- Koch, C. & Nasmyth, K. (1994)** Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 451-459.
- Koch, C., Wollmann, P., Dahl, M. & Lottspeich, F. (1999)** A role for Ctr9p and Paf1p in the regulation G1 cyclin expression in yeast. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2126-2134.
- Koehler, C. M. & Myers, A. M. (1997)** Serine-threonine protein kinase activity of Elm1p, a regulator of morphologic differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **408**, 109-114.
- Köhler, F. (2003)** A yeast-based growth assay for the analysis of site-specific proteases. *Nucleic Acids Res*, **31**, e16.
- Koltin, Y. & Day, P. R. (1975)** Specificity of *Ustilago maydis* killer proteins. *Appl Microbiol*, **30**, 694-696.
- Kornberg, R. D. (2005)** Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem Sci*, **30**, 235-239.
- Krogan, N. J., Kim, M., Ahn, S. H., Zhong, G., Kobor, M. S., Cagney, G., Emili, A. et al. (2002)** RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol Cell Biol*, **22**, 6979-6992.
- Kuchin, S., Yeghiayan, P. & Carlson, M. (1995)** Cyclin-dependent protein kinase and cyclin homologs SSN3 and SSN8 contribute to transcriptional control in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4006-4010.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Larabee, R. N., Krogan, N. J., Xiao, T., Shibata, Y., Hughes, T. R., Greenblatt, J. F. & Strahl, B. D. (2005)** BUR kinase selectively regulates H3 K4 trimethylation and H2B ubiquitylation through recruitment of the PAF elongation complex. *Curr Biol*, **15**, 1487-1493.
- Larschan, E. & Winston, F. (2001)** The *S. cerevisiae* SAGA complex functions *in vivo* as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev*, **15**, 1946-1956.
- Lee, J. M. & Greenleaf, A. L. (1991)** CTD kinase large subunit is encoded by CTK1, a gene required for normal growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene Expr*, **1**, 149-167.
- Lee, J. M. & Greenleaf, A. L. (1997)** Modulation of RNA polymerase II elongation efficiency by C-terminal heptapeptide repeat domain kinase I. *J Biol Chem*, **272**, 10990-10993.

- Lee, Y. C. & Kim, Y. J. (1998) Requirement for a functional interaction between mediator components Med6 and Srb4 in RNA polymerase II transcription. *Mol Cell Biol*, **18**, 5364-5370.
- Li, L., Quinton, T., Miles, S. & Breeden, L. L. (2005) Genetic interactions between mediator and the late G1-specific transcription factor Swi6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **171**, 477-488.
- Li, S. & Smerdon, M. J. (2002) Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **21**, 5921-5929.
- Liao, S. M., Zhang, J., Jeffery, D. A., Koleske, A. J., Thompson, C. M., Chao, D. M., Viljoen, M. et al. (1995) A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature*, **374**, 193-196.
- Lowes, K. F., Shearman, C. A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D. B., Merry, R. J. & Gasson, M. J. (2000) Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1066-1076.
- Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M. J. & Bystrom, A. S. (2005) The *Kluyveromyces lactis* gamma-toxin targets tRNA anticodons. *Rna*, **11**, 1648-1654.
- Macara, I. G. (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 570-594, table of contents.
- MacKay, V. L., Mai, B., Waters, L. & Breeden, L. L. (2001) Early cell cycle box-mediated transcription of CLN3 and SWI4 contributes to the proper timing of the G(1)-to-S transition in budding yeast. *Mol Cell Biol*, **21**, 4140-4148.
- Magliani, W., Conti, S., Arseni, S., Frazzi, R., Salati, A. & Polonelli, L. (2001) Killer anti-idiotypes in the control of fungal infections. *Curr Opin Investig Drugs*, **2**, 477-479.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. & Polonelli, L. (1997) Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*, **10**, 369-400.
- Makio, T., Stanton, L. H., Lin, C. C., Goldfarb, D. S., Weis, K. & Wozniak, R. W. (2009) The nucleoporins Nup170p and Nup157p are essential for nuclear pore complex assembly. *J Cell Biol*, **185**, 459-473.
- Manderson, E. N., Malleshaiah, M. & Michnick, S. W. (2008) A novel genetic screen implicates Elm1 in the inactivation of the yeast transcription factor SBF. *PLoS One*, **3**, e1500.
- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J. & Reggiori, F. (2010) An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol*, **190**, 1005-1022.
- Matsubayashi, Y., Fukuda, M. & Nishida, E. (2001) Evidence for existence of a nuclear pore complex-mediated, cytosol-independent pathway of nuclear translocation of ERK MAP kinase in permeabilized cells. *J Biol Chem*, **276**, 41755-41760.
- Mayerhofer, P. U., Cook, J. P., Wahlman, J., Pinheiro, T. T., Moore, K. A., Lord, J. M., Johnson, A. E. et al. (2009) Ricin A chain insertion into endoplasmic reticulum membranes is triggered by a temperature increase to 37 {degrees}C. *J Biol Chem*, **284**, 10232-10242.
- McInerney, C. J., Partridge, J. F., Mikesell, G. E., Creemer, D. P. & Breeden, L. L. (1997) A novel Mcm1-dependent element in the SWI4, CLN3, CDC6, and CDC47 promoters activates M/G1-specific transcription. *Genes Dev*, **11**, 1277-1288.
- McSweeney, L. A. & Dreyfus, L. A. (2004) Nuclear localization of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin CdtB subunit. *Cell Microbiol*, **6**, 447-458.
- Measday, V., Moore, L., Ogas, J., Tyers, M. & Andrews, B. (1994) The PCL2 (ORFD)-PHO85 cyclin-dependent kinase complex: a cell cycle regulator in yeast. *Science*, **266**, 1391-1395.
- Measday, V., Moore, L., Retnakaran, R., Lee, J., Donoviel, M., Neiman, A. M. & Andrews, B. (1997) A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol*, **17**, 1212-1223.
- Meggio, F. & Pinna, L. A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *Faseb J*, **17**, 349-368.

- Meidlinger, M. (2001)** Untersuchungen zur Protein/Protein-Interaktion zwischen der α -Untereinheit des viralen K28-Toxins und Zellzyklus-Proteinen der Hefe. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Mendenhall, M. D., al-Jumaily, W. & Nugroho, T. T. (1995)** The Cdc28 inhibitor p40SIC1. *Prog Cell Cycle Res*, **1**, 173-185.
- Metzger, M. B., Maurer, M. J., Dancy, B. M. & Michaelis, S. (2008)** Degradation of a cytosolic protein requires endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *J Biol Chem*, **283**, 32302-32316.
- Miller, M. E. & Cross, F. R. (2001)** Mechanisms controlling subcellular localization of the G(1) cyclins Cln2p and Cln3p in budding yeast. *Mol Cell Biol*, **21**, 6292-6311.
- Milne, G. T., Jin, S., Shannon, K. B. & Weaver, D. T. (1996)** Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **16**, 4189-4198.
- Mo, M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2009)** Cell cycle deregulation by a poxvirus partial mimic of anaphase-promoting complex subunit 11. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 19527-19532.
- Mo, M., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2010)** Orf virus cell cycle regulator, PACR, competes with subunit 11 of the anaphase promoting complex for incorporation into the complex. *J Gen Virol*, **91**, 3010-3015.
- Mo, M., Shahar, S., Fleming, S. B. & Mercer, A. A. (2012)** How viruses affect the cell cycle through manipulation of the APC/C. *Trends Microbiol*, **20**, 440-448.
- Moffat, J. & Andrews, B. (2004)** Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat Cell Biol*, **6**, 59-66.
- Moriya, H. & Isono, K. (1999)** Analysis of genetic interactions between DHH1, SSD1 and ELM1 indicates their involvement in cellular morphology determination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 481-496.
- Moroianu, J. (1999)** Nuclear import and export pathways. *J Cell Biochem*, **Suppl 32-33**, 76-83.
- Mortazavi, A., Williams, B. A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. (2008)** Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, **5**, 621-628.
- Mueller, C. L. & Jaehning, J. A. (2002)** Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. *Mol Cell Biol*, **22**, 1971-1980.
- Murakami, S. & Livingston, D. M. (1982)** Cell cycle inhibition of yeast spheroplasts. *Mol Gen Genet*, **185**, 506-509.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M. & Snyder, M. (2008)** The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*, **320**, 1344-1349.
- Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., Gertler, F. B., Mendenhall, M. D., Sicheri, F. et al. (2001)** Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*, **414**, 514-521.
- Nash, R., Tokiwa, G., Anand, S., Erickson, K. & Futcher, A. B. (1988)** The WHI1+ gene of *Saccharomyces cerevisiae* tethers cell division to cell size and is a cyclin homolog. *Embo J*, **7**, 4335-4346.
- Nasmyth, K. (2001)** Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet*, **35**, 673-745.
- Nasmyth, K. & Dirick, L. (1991)** The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell*, **66**, 995-1013.
- Noton, E. & Diffley, J. F. (2000)** CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol Cell*, **5**, 85-95.
- Novotná, D., Flegelova, H. & Janderova, B. (2004)** Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **4**, 803-813.
- Ogas, J., Andrews, B. J. & Herskowitz, I. (1991)** Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell*, **66**, 1015-1026.

- Ostapenko, D. & Solomon, M. J. (2005)** Phosphorylation by Cak1 regulates the C-terminal domain kinase Ctk1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **25**, 3906-3913.
- Otero, G., Fellows, J., Li, Y., de Bizemont, T., Dirac, A. M., Gustafsson, C. M., Erdjument-Bromage, H. et al. (1999)** Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation. *Mol Cell*, **3**, 109-118.
- Paine, P. L., Moore, L. C. & Horowitz, S. B. (1975)** Nuclear envelope permeability. *Nature*, **254**, 109-114.
- Palmiter, R. D., Behringer, R. R., Quaife, C. J., Maxwell, F., Maxwell, I. H. & Brinster, R. L. (1987)** Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell*, **50**, 435-443.
- Pante, N. & Kann, M. (2002)** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*, **13**, 425-434.
- Park, C. M., Berry, J. O. & Bruenn, J. A. (1996)** High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*, **30**, 359-366.
- Park, C. M., Bruenn, J. A., Ganesa, C., Flurkey, W. F., Bozarth, R. F. & Koltin, Y. (1994)** Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol*, **11**, 155-164.
- Partridge, J. F., Mikesell, G. E. & Breeden, L. L. (1997)** Cell cycle-dependent transcription of CLN1 involves swi4 binding to MCB-like elements. *J Biol Chem*, **272**, 9071-9077.
- Passmore, L. A., Booth, C. R., Venien-Bryan, C., Ludtke, S. J., Fioretto, C., Johnson, L. N., Chiu, W. et al. (2005)** Structural analysis of the anaphase-promoting complex reveals multiple active sites and insights into polyubiquitylation. *Mol Cell*, **20**, 855-866.
- Pérez, F., Ramirez, M. & Regodón, J. A. (2001)** Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **79**, 393-399.
- Petering, J. E., Symons, M. R., Langridge, P. & Henschke, P. A. (1991)** Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Appl Environ Microbiol*, **57**, 3232-3236.
- Peters, J. M. (2002)** The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, **9**, 931-943.
- Peters, J. M. (2006)** The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 644-656.
- Pfeiffer, P. & Radler, F. (1982)** Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxins of *Saccharomyces cerevisiae*-strain 28. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2699-2706.
- Pokholok, D. K., Hannett, N. M. & Young, R. A. (2002)** Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression *in vivo*. *Mol Cell*, **9**, 799-809.
- Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernardis, F. & Morace, G. (1986)** Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. *Mycopathologia*, **96**, 103-107.
- Polymenis, M. & Schmidt, E. V. (1997)** Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev*, **11**, 2522-2531.
- Poppek, C. (2011)** Untersuchungen zur Protein/Protein-Interaktion zwischen der α -Untereinheit des viralen Killertoxins K28 und den Hefeproteinen Apc2p, Zds1p und Prp42p. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Porter, S. E., Washburn, T. M., Chang, M. & Jaehning, J. A. (2002)** The yeast Paf1-RNA polymerase II complex is required for full expression of a subset of cell cycle-regulated genes. *Eukaryot Cell*, **1**, 830-842.
- Powilleit, F. (2004)** Entwicklung viraler Expressionssysteme und deren Anwendungsmöglichkeiten in Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Pruschy, M., Ju, Y., Spitz, L., Carafoli, E. & Goldfarb, D. S. (1994)** Facilitated nuclear transport of calmodulin in tissue culture cells. *J Cell Biol*, **127**, 1527-1536.
- Pyerin, W., Barz, T. & Ackermann, K. (2005)** Protein kinase CK2 in gene control at cell cycle entry. *Mol Cell Biochem*, **274**, 189-200.
- Queralt, E. & Igual, J. C. (2004)** Functional distinction between Cln1p and Cln2p cyclins in the control of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic cycle. *Genetics*, **168**, 129-140.

- Radler, F., Herzberger, S., Schonig, I. & Schwarz, P. (1993) Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *J Gen Microbiol*, **139**, 495-500.
- Rahl, P. B., Chen, C. Z. & Collins, R. N. (2005) Elp1p, the yeast homolog of the FD disease syndrome protein, negatively regulates exocytosis independently of transcriptional elongation. *Mol Cell*, **17**, 841-853.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. & Aebi, U. (1990) Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol*, **110**, 883-894.
- Reiter, J. (2004) Untersuchungen zur Wirkungsweise eines viralen A/B-Toxins der Hefe: Kernlokalisierung, Apoptose und Zellzyklusarrest. *Dissertation*, Universität des Saarlands, Saarbrücken.
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F. & Schmitt, M. J. (2005) Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Biol*, **168**, 353-358.
- Ribas, J. C., Fujimura, T. & Wickner, R. B. (1994) Essential RNA binding and packaging domains of the Gag-Pol fusion protein of the L-A double-stranded RNA virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **269**, 28420-28428.
- Ribbeck, K. & Gorlich, D. (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J*, **20**, 1320-1330.
- Riffer, F., Eisfeld, K., Breinig, F. & Schmitt, M. J. (2002) Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **148**, 1317-1328.
- Roberts, C. J., Raymond, C. K., Yamashiro, C. T. & Stevens, T. H. (1991) Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol*, **194**, 644-661.
- Robinson, J. S., Klionsky, D. J., Banta, L. M. & Emr, S. D. (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol*, **8**, 4936-4948.
- Rodriguez-Cousino, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R. & Ramirez, M. (2011) A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded rna virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 1822-1832.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A. & Clare, J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, **8**, 423-488.
- Romeo, M. J., Angus-Hill, M. L., Sobering, A. K., Kamada, Y., Cairns, B. R. & Levin, D. E. (2002) HTL1 encodes a novel factor that interacts with the RSC chromatin remodeling complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **22**, 8165-8174.
- Rondón, A. G., Jimeno, S., García-Rubio, M. & Aguilera, A. (2003) Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation. *J Biol Chem*, **278**, 39037-39043.
- Rossio, V. & Yoshida, S. (2011) Spatial regulation of Cdc55-PP2A by Zds1/Zds2 controls mitotic entry and mitotic exit in budding yeast. *J Cell Biol*, **193**, 445-454.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. & Chait, B. T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, **148**, 635-651.
- Rout, M. P. & Blobel, G. (1993) Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **123**, 771-783.
- Rudner, A. D. & Murray, A. W. (2000) Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol*, **149**, 1377-1390.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*: Cold Spring Harbor.
- Sampath, V. & Sadhale, P. (2005) Rpb4 and Rpb7: a sub-complex integral to multi-subunit RNA polymerases performs a multitude of functions. *IUBMB Life*, **57**, 93-102.

- Sandvig, K., Torgersen, M. L., Engedal, N., Skotland, T. & Iversen, T. G. (2010) Protein toxins from plants and bacteria: probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett*, **584**, 2626-2634.
- Santos, A., Alonso, A., Belda, I. & Marquina, D. (2012) Cell cycle arrest and apoptosis, two alternative mechanisms for PMKT2 killer activity. *Fungal Genet Biol*, **50**, 44-54.
- Santos, A., Del Mar Alvarez, M., Mauro, M. S., Abrusci, C. & Marquina, D. (2005) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *J Biol Chem*, **280**, 41881-41892.
- Santos, A. & Marquina, D. (2011) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to proapoptotic concentrations of *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Fungal Genet Biol*, **48**, 979-989.
- Santos, A., San Mauro, M., Bravo, E. & Marquina, D. (2009) PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, **155**, 624-634.
- Sari, F., Braus, G. H. & Irniger, S. (2007) A process independent of the anaphase-promoting complex contributes to instability of the yeast S phase cyclin Clb5. *J Biol Chem*, **282**, 26614-26622.
- Schägger, H. & Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 368-379.
- Schäuble, N. (2008) Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zur Identifizierung von *in vivo* Interaktionspartnern des viralen K28 Toxins in Hefe. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Schiestl, R. H. & Gietz, R. D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-346.
- Schmitt, M. & Radler, F. (1987) Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J Gen Microbiol*, **133**, 3347-3354.
- Schmitt, M. & Radler, F. (1988) Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin KT28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **170**, 2192-2196.
- Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2002) The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, 257-276.
- Schmitt, M. J. & Breinig, F. (2006) Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 212-221.
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schonig, I. & Tipper, D. J. (1996) Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiology*, **142** (Pt 9), 2655-2662.
- Schmitt, M. J., Poravou, O., Trenz, K. & Rehfeldt, K. (1997) Unique double-stranded RNAs responsible for the anti-*Candida* activity of the yeast *Hanseniaspora uvarum*. *J Virol*, **71**, 8852-8855.
- Schmitt, M. J. & Reiter, J. (2008) Viral induced yeast apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 1413-1417.
- Schmitt, M. J. & Schernikau, G. (1997) Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Techn. Biotechnol*, **35**, 281-285.
- Schmitt, M. J. & Tipper, D. J. (1990) K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **10**, 4807-4815.
- Schmitt, M. J. & Tipper, D. J. (1992) Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast*, **8**, 373-384.
- Schmitt, M. J. & Tipper, D. J. (1995) Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin. *Virology*, **213**, 341-351.
- Schnöder, T. (2009) Untersuchungen zum intrazellulären Transportweg und der *in vivo* Toxizität von Ricin A (RTA) in Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D. & Nasmyth, K. (1994) The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell*, **79**, 233-244.
- Schwob, E. & Nasmyth, K. (1993) CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **7**, 1160-1175.

- Sedgwick, C., Rawluk, M., Decesare, J., Raithatha, S., Wohlschlegel, J., Semchuk, P., Ellison, M. *et al.* (2006) *Saccharomyces cerevisiae* Ime2 phosphorylates Sic1 at multiple PXS/T sites but is insufficient to trigger Sic1 degradation. *Biochem J*, **399**, 151-160.
- Seguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E. & Cailliez, J. C. (1998) Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **22**, 145-149.
- Selitreffnikoff, C. P. (2001) Antifungal proteins. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 2883-2894.
- Sendzik, T. (2003) Untersuchung zur *in vivo* Toxizität und Immunität der α/β -heterodimeren Virustoxine K1 und K28 durch regulierte Expression einzelner Toxinuntereinheiten *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Sendzik, T. (2006) Identifizierung essentieller Komponenten des intrazellulären Transports eines viralen A/B-Toxins der Hefe. *Dissertation*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Sha, B., Lee, S. & Cyr, D. M. (2000) The crystal structure of the peptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. *Structure*, **8**, 799-807.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods*, **2**, 905-909.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, **28**, 815-820.
- Shaw, M. R., Schiek, R. & Wittrup, K. D. (1993) Stochastic stimulation of 2 μ multicopy plasmid amplification in yeast. *Biotechnol Prog*, **9**, 160-165.
- Sheaff, R. J. & Roberts, J. M. (1996) End of the line: proteolytic degradation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Chem Biol*, **3**, 869-873.
- Shen, W. C., Bhaumik, S. R., Causton, H. C., Simon, I., Zhu, X., Jennings, E. G., Wang, T. H. *et al.* (2003) Systematic analysis of essential yeast TAFs in genome-wide transcription and preinitiation complex assembly. *Embo J*, **22**, 3395-3402.
- Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, **350**, 3-41.
- Shulga, N., Mosammaparast, N., Wozniak, R. & Goldfarb, D. S. (2000) Yeast nucleoporins involved in passive nuclear envelope permeability. *J Cell Biol*, **149**, 1027-1038.
- Sikorski, R. S. & 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.
- Siniosoglou, S., Lutzmann, M., Santos-Rosa, H., Leonard, K., Mueller, S., Aebi, U. & Hurt, E. (2000) Structure and assembly of the Nup84p complex. *J Cell Biol*, **149**, 41-54.
- Siniosoglou, S., Wimmer, C., Rieger, M., Doye, V., Tekotte, H., Weise, C., Emig, S. *et al.* (1996) A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell*, **84**, 265-275.
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J. & Harper, J. W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell*, **91**, 209-219.
- Slot, J. W., Geuze, H. J., Gigengack, S., Lienhard, G. E. & James, D. E. (1991) Immunolocalization of the insulin regulatable glucose transporter in brown adipose tissue of the rat. *J Cell Biol*, **113**, 123-135.
- Smith, C. L., Horowitz-Scherer, R., Flanagan, J. F., Woodcock, C. L. & Peterson, C. L. (2003) Structural analysis of the yeast SWI/SNF chromatin remodeling complex. *Nat Struct Biol*, **10**, 141-145.
- Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M. *et al.* (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell*, **21**, 319-330.
- Sorokin, A. V., Kim, E. R. & Ovchinnikov, L. P. (2007) Nucleocytoplasmic transport of proteins. *Biochemistry (Mosc)*, **72**, 1439-1457.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O. *et al.* (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, **9**, 3273-3297.

- Sreenivasan, A., Bishop, A. C., Shokat, K. M. & Kellogg, D. R. (2003)** Specific inhibition of Elm1 kinase activity reveals functions required for early G1 events. *Mol Cell Biol*, **23**, 6327-6337.
- Sreenivasan, A. & Kellogg, D. (1999)** The elm1 kinase functions in a mitotic signaling network in budding yeast. *Mol Cell Biol*, **19**, 7983-7994.
- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A. & Phaff, H. J. (1987)** The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can J Microbiol*, **33**, 783-796.
- Steiner, D. F., Smeekens, S. P., Ohagi, S. & Chan, S. J. (1992)** The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem*, **267**, 23435-23438.
- Sterner, D. E., Lee, J. M., Hardin, S. E. & Greenleaf, A. L. (1995)** The yeast carboxyl-terminal repeat domain kinase CTDK-I is a divergent cyclin-cyclin-dependent kinase complex. *Mol Cell Biol*, **15**, 5716-5724.
- Stewart, M. (2007)** Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 195-208.
- Stolinski, L. A., Eisenmann, D. M. & Arndt, K. M. (1997)** Identification of RTF1, a novel gene important for TATA site selection by TATA box-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 4490-4500.
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M. & Rout, M. P. (2010)** The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **11**, 490-501.
- Strasser, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A. G. et al. (2002)** TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, **417**, 304-308.
- Strawn, L. A., Shen, T., Shulga, N., Goldfarb, D. S. & Wentz, S. R. (2004)** Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat Cell Biol*, **6**, 197-206.
- Stuart, D. & Wittenberg, C. (1994)** Cell cycle-dependent transcription of CLN2 is conferred by multiple distinct cis-acting regulatory elements. *Mol Cell Biol*, **14**, 4788-4801.
- Stuart, D. & Wittenberg, C. (1995)** CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. *Genes Dev*, **9**, 2780-2794.
- Studte, P., Zink, S., Jablonowski, D., Bar, C., von der Haar, T., Tuite, M. F. & Schaffrath, R. (2008)** tRNA and protein methylase complexes mediate zymocin toxicity in yeast. *Mol Microbiol*, **69**, 1266-1277.
- Sung, M. K. & Huh, W. K. (2007)** Bimolecular fluorescence complementation analysis system for *in vivo* detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **24**, 767-775.
- Svensson, J. P., Pesudo, L. Q., Fry, R. C., Adeleye, Y. A., Carmichael, P. & Samson, L. D. (2011)** Genomic phenotyping of the essential and non-essential yeast genome detects novel pathways for alkylation resistance. *BMC Syst Biol*, **5**, 157.
- Swanson, R., Locher, M. & Hochstrasser, M. (2001)** A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev*, **15**, 2660-2674.
- Symington, L. S. (2002)** Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 630-670, table of contents.
- Taberner, F. J., Quilis, I. & Igual, J. C. (2009)** Spatial regulation of the start repressor Whi5. *Cell Cycle*, **8**, 3010-3018.
- Takagi, Y. & Kornberg, R. D. (2005)** Mediator as a general transcription factor. *J Biol Chem*, **281**, 80-89.
- Thewes, S. (2009)** Identifizierung Zellzyklus-spezifischer Interaktionspartner des viralen K28 α -Toxins mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Timson, D. J. (2007)** Galactose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dyn Biochem Process Biotechnol Mol Biol*, **1**, 63-73.

- Tokunaga, M., Kawamura, A. & Hishinuma, F. (1989)** Expression of pGKL killer 28K subunit in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of 28K subunit as a killer protein. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3435-3446.
- Toone, W. M., Aerne, B. L., Morgan, B. A. & Johnston, L. H. (1997)** Getting started: regulating the initiation of DNA replication in yeast. *Annu Rev Microbiol*, **51**, 125-149.
- Tous, C., Rondon, A. G., Garcia-Rubio, M., Gonzalez-Aguilera, C., Luna, R. & Aguilera, A. (2011)** A novel assay identifies transcript elongation roles for the Nup84 complex and RNA processing factors. *Embo J*, **30**, 1953-1964.
- Townsley, F. M., Frigerio, G. & Pelham, H. R. (1994)** Retrieval of HDEL proteins is required for growth of yeast cells. *J Cell Biol*, **127**, 21-28.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H. et al. (2012)** Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc*, **7**, 562-578.
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L. et al. (2010)** Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, **28**, 511-515.
- Tripodi, F., Zinzalla, V., Vanoni, M., Alberghina, L. & Coccetti, P. (2007)** In CK2 inactivated cells the cyclin dependent kinase inhibitor Sic1 is involved in cell-cycle arrest before the onset of S phase. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 921-927.
- Tschumper, G. & Carbon, J. (1983)** Copy number by a yeast centromere. *Gene*, **23**, 221-232.
- Tsien, R. Y. (1998)** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, **67**, 509-544.
- Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. (2001)** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5116-5121.
- Tyers, M. & Futcher, B. (1993)** Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Mol Cell Biol*, **13**, 5659-5669.
- Vagnoli, P., Musmanno, R. A., Cresti, S., Di Maggio, T. & Coratza, G. (1993)** Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the tuscan region of Italy. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 4037-4043.
- Valis, K., Masek, T., Novotná, D., Pospíšek, M. & Janderová, B. (2006)** Immunity to killer toxin K1 is connected with the Golgi-to-vacuole protein degradation pathway. *Folia Microbiol (Praha)*, **51**, 196-202.
- Vera, J. C., Wheat, C. W., Fescemyer, H. W., Frilander, M. J., Crawford, D. L., Hanski, I. & Marden, J. H. (2008)** Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Mol Ecol*, **17**, 1636-1647.
- Vergara, S. V., Puig, S. & Thiele, D. J. (2011)** Early recruitment of AU-rich element-containing mRNAs determines their cytosolic fate during iron deficiency. *Mol Cell Biol*, **31**, 417-429.
- Verma, R., Annan, R. S., Huddleston, M. J., Carr, S. A., Reynard, G. & Deshaies, R. J. (1997)** Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*, **278**, 455-460.
- Versées, W., De Groeve, S. & Van Lijsebettens, M. (2010)** Elongator, a conserved multitasking complex? *Mol Microbiol*, **76**, 1065-1069.
- Vidan, S. & Snyder, M. (2001)** Large-scale mutagenesis: yeast genetics in the genome era. *Curr Opin Biotechnol*, **12**, 28-34.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M. & Amon, A. (1998)** The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell*, **2**, 709-718.
- Volz, A.-L. (2005)** Untersuchungen zum intrazellulären Transport von Proteinen mit dualem Targetingsignal zum posttranslationalen Import in ER und Zellkern. *Diplomarbeit*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Walker, S. S., Shen, W. C., Reese, J. C., Apone, L. M. & Green, M. R. (1997)** Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state. *Cell*, **90**, 607-614.

- Walmacq, C., Kireeva, M. L., Irvin, J., Nedialkov, Y., Lubkowska, L., Malagon, F., Strathern, J. N. *et al.* (2009) Rpb9 subunit controls transcription fidelity by delaying NTP sequestration in RNA polymerase II. *J Biol Chem*, **284**, 19601-19612.
- Wang, H., Carey, L. B., Cai, Y., Wijnen, H. & Futcher, B. (2009) Recruitment of Cln3 cyclin to promoters controls cell cycle entry via histone deacetylase and other targets. *PLoS Biol*, **7**, e1000189.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, **10**, 57-63.
- Wäsch, R. & Cross, F. R. (2002) APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature*, **418**, 556-562.
- Weiler, F., Rehfeldt, K., Bautz, F. & Schmitt, M. J. (2002) The *Zygosaccharomyces bailii* antifungal virus toxin zygocin: cloning and expression in a heterologous fungal host. *Mol Microbiol*, **46**, 1095-1105.
- Weiss, W., Weiland, F. & Gorg, A. (2009) Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Methods Mol Biol*, **564**, 59-82.
- Wen, F., Nair, N. U. & Zhao, H. (2009) Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. *Curr Opin Biotechnol*, **20**, 412-419.
- Wente, S. R. & Rout, M. P. (2010) The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a000562.
- White, M. A., Riles, L. & Cohen, B. A. (2009) A systematic screen for transcriptional regulators of the yeast cell cycle. *Genetics*, **181**, 435-446.
- Whitehurst, A. W., Wilsbacher, J. L., You, Y., Luby-Phelps, K., Moore, M. S. & Cobb, M. H. (2002) ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7496-7501.
- Wickner, R. B. (1989) Yeast virology. *Faseb J*, **3**, 2257-2265.
- Wickner, R. B. (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **60**, 250-265.
- Wicky, S., Tjandra, H., Schieltz, D., Yates, J., 3rd & Kellogg, D. R. (2011) The Zds proteins control entry into mitosis and target protein phosphatase 2A to the Cdc25 phosphatase. *Mol Biol Cell*, **22**, 20-32.
- Willems, A. R., Goh, T., Taylor, L., Chernushevich, I., Shevchenko, A. & Tyers, M. (1999) SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1533-1550.
- Wilson, B., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Cairns, B. R. (2006) The RSC chromatin remodeling complex bears an essential fungal-specific protein module with broad functional roles. *Genetics*, **172**, 795-809.
- Winey, M., Yasar, D., Giddings, T. H., Jr. & Mastronarde, D. N. (1997) Nuclear pore complex number and distribution throughout the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol Biol Cell*, **8**, 2119-2132.
- Wittenberg, C., Sugimoto, K. & Reed, S. I. (1990) G1-specific cyclins of *S. cerevisiae*: cell cycle periodicity, regulation by mating pheromone, and association with the p34CDC28 protein kinase. *Cell*, **62**, 225-237.
- Woods, D. R. & Bevan, E. A. (1968) Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, **51**, 115-126.
- Woychik, N. A., Lane, W. S. & Young, R. A. (1991) Yeast RNA polymerase II subunit RPB9 is essential for growth at temperature extremes. *J Biol Chem*, **266**, 19053-19055.
- Wu, P. Y., Ruhlmann, C., Winston, F. & Schultz, P. (2004) Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell*, **15**, 199-208.
- Wu, W. S. & Li, W. H. (2008) Systematic identification of yeast cell cycle transcription factors using multiple data sources. *BMC Bioinformatics*, **9**, 522.
- Xiao, Z., McGrew, J. T., Schroeder, A. J. & Fitzgerald-Hayes, M. (1993) CSE1 and CSE2, two new genes required for accurate mitotic chromosome segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **13**, 4691-4702.

- Yamamoto, T., Imai, M., Tachibana, K. & Mayumi, M. (1986)** Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS Lett*, **195**, 253-257.
- Yao, S., Neiman, A. & Prelich, G. (2000)** BUR1 and BUR2 encode a divergent cyclin-dependent kinase-cyclin complex important for transcription *in vivo*. *Mol Cell Biol*, **20**, 7080-7087.
- Yao, S. & Prelich, G. (2002)** Activation of the Bur1-Bur2 cyclin-dependent kinase complex by Cak1. *Mol Cell Biol*, **22**, 6750-6758.
- Yokomori, Y., Akiyama, H. & Schimizu, K. (1988)** Isolation of a wild *Candida* killer yeast with a novel killer property. *Agric Biol Chem*, **52**, 2791-2796.
- Young, T. W. & Yagiu, M. (1978)** A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **44**, 59-77.
- Yu, Y., Jiang, Y. W., Wellinger, R. J., Carlson, K., Roberts, J. M. & Stillman, D. J. (1996)** Mutations in the homologous ZDS1 and ZDS2 genes affect cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **16**, 5254-5263.
- Zapater, M., Clotet, J., Escote, X. & Posas, F. (2005)** Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell Cycle*, **4**, 6-7.
- Zhang, S., Guha, S. & Volkert, F. C. (1995)** The *Saccharomyces* SHP1 gene, which encodes a regulator of phosphoprotein phosphatase 1 with differential effects on glycogen metabolism, meiotic differentiation, and mitotic cell cycle progression. *Mol Cell Biol*, **15**, 2037-2050.
- Zhang, W., Bone, J. R., Edmondson, D. G., Turner, B. M. & Roth, S. Y. (1998)** Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *Embo J*, **17**, 3155-3167.
- Zhu, H. & Bussey, H. (1989)** The K1 Toxin of *Saccharomyces cerevisiae* Kills Spheroplasts of Many Yeast Species. *Appl Environ Microbiol*, **55**, 2105-2107.
- Zinzalla, V., Graziola, M., Mastriani, A., Vanoni, M. & Alberghina, L. (2007)** Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **63**, 1482-1494.

7 Danksagung

„Im Rahmen der vorliegenden Arbeit“ möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich im und außerhalb des Labors begleitet, unterstützt und somit zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt, der mir die Arbeit an dem interessanten und herausfordernden Thema in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und die damit verbundenen Aufgaben zugetraut hat. Trotz unendlich vielen anderen Verpflichtungen hatten Sie immer ein offenes Ohr für meine Fragen und stets die passenden Antworten. Neben vielen konstruktiven Diskussionen und fachlichen Tipps bedanke ich mich besonders für die aufmunternden und motivierenden Worte in den Momenten, in denen sie nötig waren. Vielen Dank für Ihr Vertrauen in mich.

Prof. Dr. Gabriel Schlenstedt gilt ebenfalls ein herzliches Dankeschön, nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens, sondern auch für viele anregende und konstruktive Diskussionen und Ratschläge bei Fragen zum Kerntransport.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Laborkollegen Dr. Esther Gießelmann, Nina Müller und Dr. Björn Becker. Die Arbeit mit euch im Labor war zweifellos der schönste Teil meiner Promotion. Alle meine zukünftigen Kollegen werden sich an eurer Kollegialität, Freundschaft und Einzigartigkeit messen müssen – sie werden es nicht leicht haben. Ich werde die Zeit mit euch nie vergessen.

Ein großer Dank geht an meine Lieblings-Diplomanden Sebastian Thewes, Claudia Buck und Claudia Poppek, meinen Lieblings-Bachelorstudierenden Tamara Heck, Maximilian Backes, Nathalie Jung, Mascha Korsch, Marie Minet und Fabian Riske sowie meinen Lieblings-F-Lingen Sarah Lupp und Christine Sauerland. Es hat immer Spaß gemacht euch etwas beizubringen. Gelernt habe ich von euch mindestens genauso viel. Vielen Dank für euer Interesse, euren Einsatz und eure hervorragende Arbeit.

Ebenso vielen Dank an...

... Dr. Björn Diehl. Deine Betreuung in meiner Diplomarbeit legte den Grundstein für den erfolgreichen Abschluss meiner Promotion. Auch danach warst du stets ein ehrlicher Ansprechpartner für sämtliche Probleme in- und außerhalb des Labors. Danke.

... Dr. Frank Breinig für unzählige Ratschläge und Tipps bei vielen praktischen und theoretischen Problemen und für die Erkenntnis, dass K1 das „bessere“ Toxin ist.

... die gesamte jetzige Arbeitsgruppe Molekular- und Zellbiologie sowie alle ehemaligen Mitglieder. Die lockere, freundschaftliche und konstruktive Atmosphäre hat sicherlich einen bedeutenden Teil zu dieser Arbeit beigetragen.

... Nicole Jundel für die stets schnelle Lösung aller bürokratischen Probleme und für die netten und humorvollen Unterhaltungen.

... Roswitha Schepp für ihre bedingungslose und außergewöhnliche Hilfsbereitschaft. Ohne dich würde Chaos und Anarchie herrschen.

... Andrea Karrenbauer und Sabine Pappert für ihre engagierte Hilfe bei vielen Versuchen.

... die Mitglieder der „Laufbande“ Claudia Buck, Guillaume Wendt, Björn Becker und Sylvie Dörflinger für den sportlichen Ausgleich.

... Guillaume Wendt für seine offene Art und das französische Flair in unserer AG

... Prof. Fulvio Reggiori, in dessen AG ich die Elektronenmikroskopie durchführen durfte sowie Janice Griffith für die Durchführung der Versuche

... Prof. Rolf Müller, der mir die Transkriptomanalyse ermöglichte sowie Dr. Carsten Volz, der für die Bearbeitung der Proben zuständig war und meine ständigen Nachfragen ertragen musste. Vielen Dank ebenfalls an Pavlo Lutsik, der mir bei der statistischen Auswertung meiner Transkriptomdaten geholfen hat.

... die weiteren Mitglieder der Prüfungskommission, wer auch immer dies sein wird.

... meinen Biologielehrer Herrn Eckhard Bell, der durch seinen Unterricht mein Interesse und meine Faszination an der Biologie geweckt hat.

... alle die ich vergessen habe und die sich angesprochen fühlen.

Mein größter Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie. Vielen Dank an meine Eltern, die mich stets mit Vertrauen und Rückhalt und ohne Einschränkungen in meiner Lebens- und Berufsplanung unterstützt und mir dadurch erst diesen Weg ermöglicht haben. Ein großes Dankeschön an meine Freunde für die notwendige Abwechslung außerhalb des Labors. Meiner Freundin Stefanie danke ich von ganzem Herzen nicht nur für ihre Geduld, Unterstützung und aufmunternden Worten, sondern vor allem dafür, dass sie selbst große Opfer für die Arbeit bringen musste. Vielen Dank!

8 Anhang

Tabelle 33: Durch K28 hochregulierte Gene sowie deren Eingruppierung in biologische Prozesse durch das Programm "GO Slim Mapper"

GO-Slim term	Genes annotated to the term
biological process unknown	<i>AIM10, PGM3, PRM5, PTC7, RFS1, RTS3, YCR023C, YCR075W-A, YER079W, YGL117W, YIL002W-A, YIL169C, YJR142W, YLR162W, YLR257W, ZPS1</i>
mitochondrion organization	<i>ACT1, ARC15, ARC19, ARP2, ARP3, ATP11, COA1, MRPL24, SED1, SSA1</i>
cell wall organization or biogenesis	<i>ACT1, ARP2, END3, HPF1, HSP150, PST1, SED1, SOD1</i>
cytoskeleton organization	<i>ACT1, ARC15, ARC19, ARP2, ARP3, END3</i>
response to chemical stimulus	<i>ACT1, ADR1, CUP1-1, CUP1-2, SOD1</i>
regulation of organelle organization	<i>ADR1, ARP2, ARP3, ENO1, HHT2</i>
chromatin organization	<i>ACT1, ADR1, HHT2, HTB1, NHP6B</i>
lipid metabolic process	<i>ADR1, AYR1, CK11, GPI2, LIP1</i>
endosomal transport	<i>BTN2, DID2, GGA1, IST1, SNA3</i>
organelle inheritance	<i>ACT1, ARC15, ARC19, ARP2, ARP3</i>
cellular ion homeostasis	<i>FIT3, NFU1, SOD1, TIS11, VMA4</i>
response to DNA damage stimulus	<i>ACT1, ESC2, HHT2, HTB1</i>
carbohydrate metabolic process	<i>ENO1, GLC3, MNT2, UGP1</i>
sporulation	<i>ACT1, ARP2, END3, HHT2</i>
DNA repair	<i>ACT1, ESC2, HHT2, HTB1</i>
transcription from RNA polymerase II promoter	<i>ACT1, ADR1, HTB1, NHP6B</i>
mitotic cell cycle	<i>ACT1, CSE4, ESC2, HHT2</i>
protein targeting	<i>ARP2, DID2, GGA1, SSA1</i>
ion transport	<i>BTN2, FAA1, FET4, ZRT1</i>
nucleobase-containing small molecule metabolic process	<i>ARP2, CPD1, PNP1, UGP1</i>
protein complex biogenesis	<i>ARP2, ARP3, ATP11, COA1</i>
response to oxidative stress	<i>ACT1, CUP1-1, CUP1-2, SOD1</i>
vacuole organization	<i>ACT1, ENO1, VT11</i>
protein folding	<i>BTN2, GSF2, SSA1</i>
generation of precursor metabolites and energy	<i>ENO1, GLC3, UGP1</i>
chromosome segregation	<i>CSE4, ESC2, KIN3</i>

GO-Slim term	Genes annotated to the term
transmembrane transport	<i>FET4, SSA1, ZRT1</i>
cofactor metabolic process	<i>COX15, FAA1, PNP1</i>
Golgi vesicle transport	<i>GGA1, TRS23, VTI1</i>
organelle fission	<i>CSE4, ESC2, HHT2</i>
cytokinesis	<i>ACT1, END3</i>
regulation of cell cycle	<i>ESC2, HHT2</i>
protein phosphorylation	<i>KIN3, YPK2</i>
cell budding	<i>ACT1, END3</i>
endocytosis	<i>ACT1, END3</i>
membrane fusion	<i>ENO1, VTI1</i>
RNA modification	<i>NBP35</i>
transcription from RNA polymerase III promoter	<i>NHP6B</i>
DNA-dependent transcription, initiation	<i>NHP6B</i>
protein lipidation	<i>GPI2</i>
mitochondrial translation	<i>MRPL24</i>
lipid transport	<i>FAA1</i>
oligosaccharide metabolic process	<i>UGP1</i>
vesicle organization	<i>VTI1</i>
tRNA processing	<i>NBP35</i>
histone modification	<i>ACT1</i>
proteolysis involved in cellular protein catabolic process	<i>GGA1</i>
carbohydrate transport	<i>HXT2</i>
protein glycosylation	<i>MNT2</i>
protein acylation	<i>ACT1</i>
RNA catabolic process	<i>TIS11</i>
cytoplasmic translation	<i>SSA1</i>
nuclear transport	<i>SSA1</i>
DNA recombination	<i>ESC2</i>
peptidyl-amino acid modification	<i>ACT1</i>
exocytosis	<i>ACT1</i>
peroxisome organization	<i>ADR1</i>
amino acid transport	<i>BTN2</i>
organelle fusion	<i>VTI1</i>
can not be mapped to a GO slim term	<i>APM4, CRG1, PYK2, SRL3, YBR139W</i>

Tabelle 34: Durch K28 herunterregulierte Gene sowie deren Eingruppierung in biologische Prozesse durch das Programm "GO Slim Mapper"

GO-Slim term	Genes annotated to the term
biological process unknown	<i>AIM1, ASG1, BSC6, CPR4, CSI2, CUE2, DAS2, DSE3, ECM3, ECM30, FSF1, FUN19, FYV4, GDT1, GFD2, GRX8, HIT1, HVG1, IMD4, IRC23, ISR1, JID1, JJJ2, KEL3, NNF2, NRP1, OCA5, OSW5, PAL1, PHM7, PIB2, PNS1, PSP2, RMD8, RRT14, RRT6, RTS2, SCM4, SHE10, SHH3, SKG6, SNA4, STP3, TMA16, TOS6, TTI2, UIP5, VBA4, VID27, YBL028C, YBL081W, YBR074W, YBR197C, YCL002C, YCR024C-B, YCR043C, YCR051W, YDL073W, YDL085C-A, YDL129W, YDL157C, YDL211C, YDR090C, YDR186C, YDR222W, YDR374C, YDR514C, YER034W, YER039C-A, YER053C-A, YER137C, YFL034W, YFR020W, YGL036W, YGR001C, YGR079W, YGR093W, YGR117C, YGR168C, YHR078W, YIL096C, YIL161W, YIR018C-A, YJL118W, YJL147C, YJR015W, YJR124C, YKL023C-A, YKL068W-A, YLF2, YLR042C, YLR149C, YLR253W, YLR264C-A, YLR326W, YLR363W-A, YLR407W, YLR413W, YLR455W, YML018C, YML053C, YMR144W, YMR185W, YMR209C, YMR221C, YMR253C, YMR310C, YNL011C, YNL035C, YNL108C, YNL155W, YNL162W-A, YNL217W, YNR021W, YNR061C, YOL029C, YOL036W, YOL107W, YOR238W, YOR342C, YPK3, YPL039W, YPL068C, YPL077C, YPL108W, YPL229W, YPL272C, YPR071W, YPR114W</i>
rRNA processing	<i>BFR2, BMS1, BUD21, BUD22, BUD23, CGR1, DBP10, DBP3, DBP6, DBP7, DBP8, DHR2, DIM1, DIP2, DIS3, DRS1, EBP2, EMG1, ENP1, ESF2, FAF1, FCF2, FYV7, GRC3, HAS1, HCR1, IMP3, IMP4, IPI1, IPI3, LAS1, LCP5, LSM6, MAK16, MPP6, MRM1, MRT4, MTR4, NAN1, NHP2, NIP7, NOC4, NOG1, NOP12, NOP14, NOP19, NOP2, NOP4, NOP56, NOP58, NOP9, NSA2, PNO1, POP1, POP3, POP4, POP6, POP8, PRP43, PUS7, PWP1, PWP2, RAT1, RCL1, REX4, RIO2, RIX1, RLP7, RNT1, ROK1, RPL35B, RPS0A, RPS0B, RPS11A, RPS11B, RPS13, RPS14B, RPS16A, RPS18A, RPS18B, RPS1B, RPS21B, RPS23A, RPS23B, RPS24A, RPS24B, RPS27A, RPS27B, RPS6A, RPS6B, RPS8A, RPS8B, RPS9A, RPS9B, RRP12, RRP36, RRP40, RRP42, RRP43, RRP5, RRP7, RRP9, RRS1, RVB2, SNU13, SOF1, SPB1, TIF6, TRM112, TSR1, TSR2, TSR3, URB1, UTP10, UTP11, UTP13, UTP15, UTP18, UTP20, UTP21, UTP22, UTP23, UTP25, UTP4, UTP6, UTP7, UTP8, UTP9</i>
transcription from RNA polymerase II promoter	<i>ABF1, ADA2, AFT1, ARG82, ARP7, ARP9, BAS1, BRE1, BUR2, CAF40, CCL1, CSR2, CTK1, DAL81, DAT1, DIG2, DST1, ELP2, ELP4, EPL1, FCP1, FHL1, FKH2, FRA2, GAL11, GAL80, GAT1, GLN3, GON7, GZF3, HAP3, HCM1, HFI1, HMT1, HOS1, HTL1, IFH1, IKI3, ISW2, KAE1, MED2, MED6, MED7, MET30, MET31, MET4, MGA2, MOT2, MOT3, MSN2, NOT3, NRD1, NRM1, NUP84, PCC1, PCF11, PDC2, PHO4, PHO80, PLP2, POP2, PTA1, PTI1, RAD3, RAT1, RBA50, RCO1, REB1, REF2, RNT1, RPB2, RPB3, RPB7, RPB8, RPB9, RPN4, RPO21, RPO26, RSC2, RSC3, RSC6, RTT109, RVB2, SFH1, SFL1, SFP1, SNF2, SOH1, SPT10, SPT15, SPT21, SPT3, SPT8, SRB7, STB1, STE12, STP1, STP2, SWI3, TAF11, TAF4, TAF5, TBF1, TFA1, TFB1, TFB2, TFG1, TFG2, THP2, TOA1, TOD6, TOP1, TUP1, USV1, YAP7, YHP1, YOX1</i>
cytoplasmic translation	<i>AFG3, GIR2, HCR1, MTG2, RBG1, RBG2, RPG1, RPL11A, RPL11B, RPL12A, RPL12B, RPL13A, RPL13B, RPL14A, RPL14B, RPL15B, RPL16A, RPL16B, RPL17A, RPL17B, RPL18A, RPL18B, RPL19B, RPL1A, RPL20A, RPL20B, RPL21A, RPL21B, RPL22A, RPL22B, RPL23B, RPL24B, RPL25, RPL26A, RPL26B, RPL27A, RPL27B, RPL29, RPL2A, RPL2B, RPL31A, RPL31B, RPL33A, RPL33B, RPL34A, RPL35B, RPL36A, RPL36B, RPL37A, RPL37B, RPL38, RPL42B, RPL43A, RPL6A, RPL6B, RPL7B, RPL8A, RPP1B, RPS0A, RPS0B, RPS10A, RPS11A, RPS11B, RPS13, RPS14B, RPS15, RPS16A, RPS17A, RPS17B, RPS18A, RPS18B, RPS19A, RPS19B, RPS1B, RPS21B, RPS22A, RPS22B, RPS24A, RPS24B, RPS25B, RPS26B, RPS27A, RPS27B, RPS28B, RPS29B, RPS30A, RPS30B, RPS4A, RPS4B, RPS6A, RPS6B, RPS7A, RPS7B, RPS8A, RPS8B, RPS9A, TMA46</i>

GO-Slim term	Genes annotated to the term
ribosomal small subunit biogenesis	<i>BUD21, BUD22, BUD23, DBP8, DHR2, DIP2, EMG1, ENP1, ESF2, FAF1, FCF2, FYV7, HCR1, KRE33, LSM6, NAN1, NEW1, NOC4, NOP14, NOP19, NOP58, NOP9, PNO1, PRP43, PWP2, RCL1, RIO2, ROK1, RPS0A, RPS0B, RPS11A, RPS11B, RPS13, RPS14B, RPS16A, RPS17A, RPS17B, RPS18A, RPS18B, RPS19A, RPS19B, RPS1B, RPS21B, RPS23A, RPS23B, RPS24A, RPS24B, RPS27A, RPS27B, RPS6A, RPS6B, RPS8A, RPS8B, RPS9A, RPS9B, RRP12, RRP14, RRP36, RRP5, RRP7, RRS1, SNU13, SOF1, TSR2, TSR3, UTP10, UTP11, UTP13, UTP15, UTP18, UTP20, UTP21, UTP22, UTP23, UTP25, UTP30, UTP4, UTP6, UTP7, UTP8, UTP9</i>
lipid metabolic process	<i>ALG1, APQ12, ARG82, AUR1, BRR6, BTS1, CAX4, CHO2, CPT1, CSH1, CSR1, CYB5, DAL81, DFG10, DGK1, EK11, ELO1, EPT1, ERG1, ERG10, ERG11, ERG13, ERG2, ERG20, ERG24, ERG25, ERG3, ERG4, ERG6, ERG7, FAA3, FEN1, GAA1, GAB1, GPI14, GPI17, INP51, IPT1, ISC1, KEI1, LAC1, LCB1, LCB2, LCB3, MCR1, MDE1, MET1, MET13, MEU1, MGA2, MOT3, MRI1, MSS4, MVD1, NEM1, NMA111, NSG1, NTE1, ORM1, OSH7, PDR16, PER1, PGA1, PLB3, RER2, SAM4, SLC1, SUR4, TES1, TGL1, TUP1, UPS2, URA7, YEH1, YEH2, YJU3, YPC1</i>
mitotic cell cycle	<i>ACM1, AFT1, ALK2, AMN1, BIK1, BIM1, BIR1, BRE1, BUR2, CDC123, CDC14, CDC24, CDC45, CDC55, CLB6, CSM3, CTF18, DAD3, DBF4, ECO1, ELG1, FKH2, FOB1, GIC1, GIC2, GPN2, HCM1, IBD2, IPL1, IRC15, KIN4, MAD1, MCD1, MCM16, MET30, MIF2, MPS3, NET1, NIS1, NRM1, NUD1, NUP170, PCL1, PDS1, PIN4, POL30, PSE1, PTK2, REI1, RSC3, RSC6, SAP155, SAP185, SAP190, SAP4, SAT4, SCC4, SCM3, SFH1, SHE1, SIS2, SIT4, SLK19, STB1, STE20, SWE1, TOP1, VHS2, YHP1, YHR127W, YOX1</i>
response to DNA damage stimulus	<i>ABF1, BDF1, BRE1, CDC45, CKA1, CSM3, CTF18, DEF1, DNL4, DPB2, ECO1, ELG1, EPL1, FUN30, HTL1, MCD1, MEC3, MGM101, MPH1, MSH3, MSH6, NSE1, NUP60, NUP84, OGG1, PAN3, PAP2, PDS1, PIN4, PLM2, PMS1, POL30, POL31, POL32, PPH3, PRI2, PTC2, RAD24, RAD27, RAD3, RAD33, RAD53, RAD57, RFC2, RFC3, RFC4, RPB9, RPN4, RSC2, RTT107, RTT109, SCC4, SFH1, SIT4, SLX5, SLX8, SNF2, SOH1, SPT10, TAH11, TFB1, TFB2, TOS4, TUP1, YRA1</i>
mitochondrion organization	<i>AEP2, AFG3, ATP23, CLU1, EXO5, FMP25, GEP5, HCM1, HTS1, ILV5, MAM3, MAS1, MDM20, MDM32, MDM34, MDM38, MRP10, MRP13, MRP20, MRP4, MRPL10, MRPL11, MRPL20, MRPL28, MRPL3, MRPS17, MRPS18, MRPS9, MST1, MTO1, NAT3, NGR1, PAM18, PET122, PET123, PIF1, RCF2, RIM2, RPO41, RRG9, RSM22, SAM37, SDH3, SHE9, SLS1, SUN4, SWS2, TIM23, TIM54, TOM20, TOM5, TOM70, TPK3, UGO1, UPS2, YHM2, YLH47, YML6, YPT11, ZIM17</i>
response to chemical stimulus	<i>AFG2, CLN2, CTT1, DAL81, DIG2, DSE1, EOS1, FRA2, FYV5, GAT1, GCY1, GLN3, GRX4, GZF3, HAP3, HCM1, HIP1, HSP12, IRC21, ISW2, KSS1, MCR1, MET30, MET4, MGA2, MSN2, OCA1, ORM1, PCC1, PDR16, PEA2, PLP2, PMT1, PMT2, PMT4, PTC2, PTR3, RDS3, RGA2, RPN4, SCJ1, SCP160, SIT4, SPA2, STE12, STE18, STE20, STE50, STE7, SWI3, TUP1, URM1, USV1, VMS1, VPS74, YCK2, YHK8, YLR224W, ZIM17</i>
nuclear transport	<i>APQ12, ARB1, BRL1, BRR6, BUD23, CRM1, DBP5, ECM1, GLE1, GLE2, GPN2, GPN3, HMT1, HRB1, KAP104, KAP122, LSG1, MAD1, MLP2, MTR10, NDC1, NEW1, NOG1, NOG2, NOP9, NUP1, NUP100, NUP170, NUP2, NUP42, NUP57, NUP60, NUP84, POM34, PSE1, REI1, RIX1, RIX7, RLI1, RNA1, RPS0A, RPS0B, RPS10A, RPS15, RPS18A, RPS18B, RPS19A, RPS19B, RPS2, RPS26B, RPS28B, RRS1, SRP40, SXM1, THP2, TIF6, UTP22, UTP8, YRA1</i>
DNA repair	<i>ABF1, BDF1, BRE1, CDC45, CSM3, CTF18, DEF1, DNL4, DPB2, ECO1, ELG1, EPL1, FUN30, MCD1, MGM101, MPH1, MSH3, MSH6, NSE1, NUP60, NUP84, OGG1, PAN3, PAP2, PDS1, PMS1, POL30, POL31, POL32, PPH3, PRI2, RAD24, RAD27, RAD3, RAD33, RAD53, RAD57, RFC2, RFC3, RFC4, RPB9, RPN4, RSC2, RTT107, RTT109, SCC4, SFH1, SIT4, SNF2, SOH1, SPT10, TAH11, TFB1, TFB2, YRA1</i>

GO-Slim term	Genes annotated to the term
carbohydrate metabolic process	<i>ADH1, ALG1, ALG5, ANP1, CAX4, CHS3, CHS7, EOS1, ERD1, EXG1, FKS1, GAL80, GCY1, GDB1, GNT1, HOC1, INM1, KNH1, KRE6, KTR5, KTR6, KTR7, MNN1, MNN11, MNN2, MNN9, MNT3, NDE1, NTH1, OST1, OST3, PDC2, PMI40, PMT1, PMT2, PMT4, PMT6, PSA1, RBS1, RER2, RKI1, SEC59, SNF1, SNF2, STT3, SVP26, SWI3, SWP1, TKL1, TKL2, TPS2, TSL1, UTR2, VAN1</i>
chromatin organization	<i>ABF1, ADA2, AHC1, ARD1, ARP7, ARP9, BDF1, BRE1, BUR2, CAC2, CDC26, CKS1, DPB2, EPL1, FKH2, FOB1, FUN30, HAT1, HEL2, HF11, HIF1, HOS1, HTL1, IES3, IOC2, ISW2, JHD2, LGE1, MSN2, NGG1, NSI1, PEP5, PHO4, RCO1, RNT1, RSC2, RSC3, RSC6, RTT109, RVB2, SET2, SFH1, SNF2, SPT10, SPT3, SPT8, SWC3, SWD1, SWD3, SWI3, TAF5, TOP1, TUP1</i>
ribosomal large subunit biogenesis	<i>AFG2, ALB1, ARX1, BRX1, CIC1, DBP10, DBP3, DBP6, DBP7, DRS1, IPI1, IPI3, LAS1, LSG1, MAK16, MAK21, MRT4, NIP7, NOG1, NOP12, NSA1, NSA2, PRP43, PUF6, REI1, REX4, RIX1, RIX7, RLI1, RLP24, RLP7, RPL11A, RPL11B, RPL12A, RPL12B, RPL25, RPL35B, RPL6A, RPL6B, RRP14, RRP5, RRS1, RSA4, SPB1, SQT1, SSF1, SSF2, SYO1, TIF4631, TIF6, URB1, YTM1</i>
tRNA processing	<i>CCA1, CFD1, DEG1, DUS1, DUS3, ELP2, ELP4, FMT1, GCD14, IKI3, ISU2, KTI11, MTO1, NCL1, NCS2, NCS6, NRD1, PAP2, POP1, POP3, POP4, POP6, POP8, PTA1, PUS1, PUS4, PUS7, RIB2, RPR2, SAP185, SAP190, SEN2, SEN34, SIT4, STP1, TAD2, TRM1, TRM10, TRM112, TRM12, TRM3, TRM44, TRM8, TRM82, TRM9, TRZ1, TYW3, URM1</i>
regulation of cell cycle	<i>AMN1, BIM1, BIR1, BRE1, CDC123, CDC14, CDC24, CDC55, CKS1, CLB6, CLN1, CLN2, CSM3, DBF4, ECO1, GIC1, GIC2, GIN4, HTL1, IBD2, IPL1, IRC15, KCC4, KIN4, MAD1, MEC3, NET1, NIS1, NUP170, PCL1, PHO80, PIN4, PPH3, PSE1, PTC2, RAD24, RAD53, RED1, RFC2, RSC3, SET2, SFH1, SGT1, SIS2, STE20, SWE1</i>
protein targeting	<i>AFG3, AST1, ATG27, COG1, COG4, COG6, ICE2, KAP104, KAP122, LOA1, MAS1, MTR10, NUP1, NUP100, NUP170, NUP2, NUP42, NUP57, NUP60, NUP84, PAM18, POM34, PSE1, RNA1, SAM37, SBH1, SDH3, SEC53, SEC61, SEC62, SEC63, SEC72, SIL1, SRP102, SRP14, SRP68, SRP72, SSA2, STP22, TIM23, TIM54, TOM20, TOM5, TOM70, VPS33, ZIM17</i>
signaling	<i>AVO2, BOI2, CDC24, CLN2, DSE1, FYV5, GIC1, GIC2, GIS3, KSP1, KSS1, LCB3, LEM3, MSB2, PEA2, PHO80, PKH1, PMT1, PMT2, PMT4, PPH3, PTC2, RGA2, RGD2, RSR1, SAP190, SCP160, SGT1, SHO1, SIP1, SIT4, SLG1, SLN1, SNF1, SOG2, SSK1, STE18, STE20, STE50, STE7, SYG1, TPK3, VPS74, WSC2, WSC3, YPD1</i>
nucleobase-containing compound transport	<i>APQ12, BRL1, BRR6, CRM1, DBP5, FLX1, FUI1, GLE1, GLE2, HMT1, HRB1, HUT1, LEU5, MLP2, MTR10, NEW1, NUP1, NUP100, NUP2, NUP42, NUP60, NUP84, PET9, PSE1, RIM2, RNA1, RPS0A, RPS0B, RPS10A, RPS15, RPS18A, RPS18B, RPS19A, RPS19B, RPS2, RPS26B, RPS28B, SXM1, THP2, TNA1, TOM20, UTP22, UTP8, VRG4, YRA1</i>
RNA modification	<i>BUD23, CFD1, DEG1, DIM1, DUS1, DUS3, ELP2, ELP4, EMG1, FMT1, GCD14, IKI3, ISU2, KTI11, LCP5, MRM1, MTO1, NCL1, NCS2, NCS6, NHP2, NOP56, PAP2, PUS1, PUS4, PUS7, RIB2, RRP9, SAP185, SAP190, SIT4, SPB1, TAD2, TRM1, TRM10, TRM112, TRM12, TRM3, TRM44, TRM8, TRM82, TRM9, TYW3, URM1</i>
Golgi vesicle transport	<i>AGE2, APL4, APS1, AVL9, BET3, BET5, BOS1, BRE5, CHS7, COG1, COG4, COG6, COP1, CSR1, ERD2, ERP2, ERP4, ERV15, ERV25, ERV46, GCS1, GEA2, GLO3, KES1, PEP5, RER1, RER2, RET2, SEC12, SEC21, SEC31, SEC9, SHR3, SMY2, SOP4, SSO2, SUR4, SVP26, TIP20, TRS20, VPS33, VPS74, YKT6, YPT32</i>
mRNA processing	<i>BRR1, CET1, CTK1, CWC2, CWC25, DST1, HRP1, LSM3, LSM6, LSM8, MPE1, NOT3, NRD1, PAN3, PAP1, PBP1, PCF11, PKH1, POP1, POP2, POP3, POP4, POP6, POP8, PRP24, PRP39, PRP43, PTA1, PTI1, RDS3, REF2, RNA15, RNT1, RPB7, SAD1, SLU7, SME1, SNP1, SNU13, SPP381, VTS1</i>

GO-Slim term	Genes annotated to the term
cytoskeleton organization	<i>AIM14, AME1, AVO2, BBP1, BIK1, BIM1, BIR1, BNI5, BUD14, CBK1, DAD3, GCS1, GEA2, GIN4, GRX4, HCM1, ICE2, IPL1, IRC15, KCC4, LSB5, MDM20, MIF2, MLP2, MPS3, NAT3, NDC1, NUD1, PCL1, PEA2, POM34, RGA2, RHO3, SHE1, SIT4, SLG1, SLK19, SWE1, SYP1, YHR127W</i>
cellular amino acid metabolic process	<i>AAT2, ADH1, ARG82, ARO2, ARO7, ASP1, DAL81, DFR1, DUG2, DUG3, ECM31, FAU1, FOL1, FRS2, GLO1, HIS6, HTS1, IDH1, ILV1, ILV5, LEU9, LYS4, MDE1, MES1, MET1, MET13, MET31, MET4, MEU1, MIS1, MRI1, MST1, PLB3, SAM4, SER2, SPE2, SPE4, TYS1, YGR012W, ZRC1</i>
protein complex biogenesis	<i>AFG3, ALF1, ATP23, BIK1, BIM1, BNI5, BUD14, CIN2, CYT2, DST1, FMP25, GIM3, GIM4, GIN4, HSC82, ICE2, KCC4, MDM38, MRP10, NUP170, OST3, PAC10, PEP5, PET122, PNO1, PRE4, RCF2, SAM37, SGT1, SIP1, SKI8, SRP14, SRP68, SRP72, TOM20, TOM5, VMA21, VOA1, VPH2, VPS33</i>
ion transport	<i>AFT1, ATP1, ATP2, AVT1, AVT3, BAP2, CAN1, DUR3, ECM7, FEN2, FET5, FLX1, FTR1, GNP1, GTR1, HIP1, HUT1, LEU5, MDM38, MID1, MIR1, MRS3, MUP1, PET9, PHO84, PHO91, PMA1, SMF1, SMF2, TAT1, TPO2, VBA2, VCX1, VNX1, YHL008C, YHM2, YLH47, YPQ1, YPQ2, ZRC1</i>
protein phosphorylation	<i>ALK2, BUR2, CBK1, CCL1, CKA1, CLB6, CLN1, CLN2, CTK1, DBF4, GIN4, IPL1, KCC4, KIN2, KIN4, KNS1, KSP1, KSS1, PCL1, PHO80, PKH1, PTC2, PTK2, RAD3, RAD53, SAT4, SIP1, SLN1, SMK1, SNF1, SSK1, STE20, STE7, SWE1, TFB1, TFB2, TPK3, YCK2, YCK3</i>
transmembrane transport	<i>AFG3, ATP1, ATP2, AVT3, BAP2, CAN1, FEN2, FTR1, FUJ1, FUR4, GNP1, MIR1, PAM18, PET9, PMA1, RIM2, SAM37, SBH1, SDH3, SEC61, SEC62, SEC63, SEC72, SIL1, SPF1, SSA2, STE20, TAT1, TIM23, TIM54, TOM20, TOM70, VBA2, VCX1, YPQ1, YPQ2, ZIM17</i>
organelle assembly	<i>ATG27, BMS1, BRX1, DRS1, ESF2, IPI1, IPI3, LSG1, MAK21, MRT4, NIP7, REX4, RIA1, RIX1, RPL11A, RPL11B, RPL12A, RPL12B, RPL25, RPL6A, RPL6B, RPS0A, RPS0B, RPS11A, RPS11B, RPS14B, RPS17A, RPS17B, RPS27A, RPS27B, RRP7, RSA4, SDO1, SGT1, SQT1, SSF1, SSF2</i>
cell wall organization or biogenesis	<i>AVO2, CBK1, CHS3, CHS7, CSR2, DON1, ECM33, EMW1, EXG1, FMP45, GAS1, GON7, GPI14, HLR1, HOC1, HRD1, KRE6, KTR5, KTR6, KTR7, MKC7, PKH1, PMI40, PRS5, PSA1, RNT1, SBE2, SIT4, SLG1, SMK1, STE7, SVP26, UTR2, WSC2, YE2</i>
ribosome assembly	<i>BMS1, BRX1, DRS1, ESF2, IPI1, IPI3, LSG1, MAK21, MRT4, NIP7, REX4, RIA1, RIX1, RPL11A, RPL11B, RPL12A, RPL12B, RPL25, RPL6A, RPL6B, RPS0A, RPS0B, RPS11A, RPS11B, RPS14B, RPS17A, RPS17B, RPS27A, RPS27B, RRP7, RSA4, SDO1, SQT1, SSF1, SSF2</i>
RNA catabolic process	<i>AIR1, DCS2, DIS3, EDC1, LSM3, LSM6, MOT2, MPP6, MRT4, MTR4, NMD2, NOT3, NRD1, NUC1, PAP2, PAT1, PKH1, POL31, POL32, POP2, PUB1, RAD27, RAT1, RNH201, RPB7, RRP40, RRP42, RRP43, SKI7, SKI8, SUP35, TPA1, TRF5, VTS1</i>
DNA replication	<i>ABF1, ADK1, CDC16, CDC45, CLB6, CSM3, CTF18, DBF4, DPB2, ECO1, ELG1, FOB1, LGE1, MET30, MPH1, PIF1, POL30, POL31, POL32, PRI2, RAD27, RAD53, RCO1, RFC2, RFC3, RFC4, RNH201, RSC3, SET2, SFH1, SNF2, TAH11, TBF1, TOP1</i>
nucleobase-containing small molecule metabolic process	<i>ADH1, ADK1, APT1, ATP1, ATP2, CAB1, CDC21, DCD1, FCY1, HAM1, HPT1, KAE1, MTO1, NDE1, NPY1, PCC1, PHO8, PMI40, PSA1, RAD53, RKI1, RNR1, SAM4, SDT1, SEC12, SIS2, STE18, SUA5, TKL1, TKL2, TRM12, TYW3, URA7, YMR315W</i>
chromosome segregation	<i>AFT1, AME1, BIM1, BIR1, BUR2, CSM3, CTF18, DSN1, ECO1, ELG1, FOB1, GPN2, IPL1, IRC15, MCD1, MCM16, MIF2, MPS3, NUD1, NUP170, PDS1, POL30, RFC2, RFC3, RFC4, RSC2, SCC4, SCM3, SCP160, SFH1, SIZ1, SOH1, TOP1</i>
cytokinesis	<i>ATC1, AXL2, BNI5, BOI2, BUD16, BUD17, BUD20, BUD23, BUD9, CBK1, CHS3, CTS1, DSE1, DSE2, EGT2, ERV15, GIC1, GIC2, GIN4, INN1, IPL1, KCC4, PEA2, PWP2, RAX1, RSR1, SCW11, SDS23, SHO1, SOG2, STE20, YCK2</i>

GO-Slim term	Genes annotated to the term
transcription from RNA polymerase I promoter	<i>CKA1, CTK1, DST1, GRC3, GTR1, NAN1, NSI1, REB1, RPA12, RPA135, RPA14, RPA190, RPA34, RPA43, RPA49, RPB8, RPC19, RPC40, RPO26, RRN11, RRN3, RRN6, RRN7, RXT3, SPT15, TFB1, UTP10, UTP15, UTP4, UTP8, UTP9</i>
DNA recombination	<i>BRE1, CDC45, CTF18, ELG1, FOB1, HO, IRC15, MEC3, MGM101, MPH1, MSH3, NUC1, PDS1, PIF1, POL32, PPH3, RAD24, RAD27, RAD3, RAD51, RAD57, RSC2, SET2, SKI8, SNF2, SOH1, TAH11, THP2, TOP1, ZIP1</i>
protein glycosylation	<i>ALG1, ALG5, ANP1, CAX4, EOS1, ERD1, GNT1, KTR5, KTR6, KTR7, MNN1, MNN11, MNN2, MNN9, MNT3, OST1, OST3, PMI40, PMT1, PMT2, PMT4, PMT6, PSA1, RER2, SEC59, STT3, SVP26, SWP1, VAN1</i>
peptidyl-amino acid modification	<i>ADA2, AHC1, ARD1, CTK1, DPH2, DPH5, DPH6, ECO1, EFM2, EPL1, HAT1, HFI1, HIF1, HMT1, HOS1, HPM1, JJJ3, KTI11, MDM20, NAT2, NAT3, NGG1, OST1, RTT109, SET2, SLN1, SPT3, SPT8, TAF5</i>
cofactor metabolic process	<i>ADH1, ARH1, BUD16, BUD17, CAB1, COQ1, COQ2, DFR1, ECM31, FAU1, FOL1, HEM1, HEM3, ISA1, MET1, MET8, MIS1, NDE1, NPY1, PHO8, RKI1, SAM4, SIS2, SPE2, SPE4, TKL1, TKL2, YAH1, YMR315W</i>
cellular ion homeostasis	<i>ARH1, ATM1, ATX2, EMP70, FTR1, FYV5, GRX4, ICE2, ISU2, MAM3, MDM32, MDM38, MMT1, MMT2, PER1, PHO80, PPZ1, PTK2, SAT4, SMF1, SMF2, SPF1, TMN3, VCX1, VMA16, VPH2, YVC1, ZRC1</i>
protein modification by small protein conjugation or removal	<i>ACM1, BRE1, BRE5, BUR2, CDC16, CDC26, ELP2, HEL2, LGE1, MET30, MOT2, NCS2, NCS6, NOT3, NUP60, PEP5, PSE1, PSH1, SCM3, SGT1, SIZ1, SLX5, SLX8, UBC1, UBP1, UBP10, ULA1, URM1</i>
regulation of translation	<i>AEP1, CDC123, CTK1, EDC1, GCD1, GCD11, GCD2, GCD6, GCD7, GCN3, GIS2, GLE1, HYP2, MDM38, PAT1, PBP1, PET122, PUF6, RPB7, RPL31A, RPL31B, RPS2, RPS23A, RPS23B, RPS9B, SCD6, SNF1, SUA5</i>
proteolysis involved in cellular protein catabolic process	<i>ADD37, CDC16, CDC26, CNE1, DAS1, DEF1, HRD1, LCL2, MET30, MGR1, MNL1, MNL2, PMT1, PMT2, PRE4, PSH1, PTH2, RPN4, RPN7, SCJ1, SCM3, SEC61, STP22, UBC1, VMS1, YDR161W, YLR224W</i>
organelle fission	<i>AFT1, ALK2, BIK1, BIM1, BIR1, BUR2, CSM3, CTF18, DAD3, EBP2, ECO1, ELG1, FOB1, GPN2, IBD2, IRC15, MAD1, MCD1, MCM16, MPS3, NIS1, NUP170, PDS1, POL30, PSE1, SCC4, TOP1</i>
meiotic cell cycle	<i>AFT1, ALK2, BRE1, CSM3, DON1, IPL1, IRC15, MPS3, MSH3, MSH6, NUD1, PDS1, PMS1, POL30, PPH3, RAD24, RAD51, RAD57, RED1, SCP160, SET2, SKI8, SLK19, SOH1, SWE1, ZIP1</i>
regulation of organelle organization	<i>ADA2, AIM14, BDF1, BIK1, BIM1, BUD14, BUR2, DAD3, ECO1, IBD2, MAD1, MDM38, NIS1, NSI1, NUP170, PEP5, PET122, PIF1, PSE1, RHO3, SEC12, SET2, SWE1, TBF1, VPS33</i>
DNA-dependent transcription, elongation	<i>ARP7, ARP9, CAF40, CTK1, DST1, FKH2, HMT1, HTL1, MOT2, NOT3, POP2, RCO1, RPA34, RPA49, RPB9, RSC2, RSC3, RSC6, SET2, SFH1, TFG1, TFG2, THP2, TOP1</i>
histone modification	<i>ADA2, AHC1, ARD1, BRE1, BUR2, EPL1, HAT1, HEL2, HFI1, HIF1, HOS1, JHD2, LGE1, NGG1, PEP5, RCO1, RTT109, SET2, SPT3, SPT8, SWD1, SWD3, TAF5</i>
mitochondrial translation	<i>AEP2, HTS1, MDM38, MRP10, MRP13, MRP20, MRP4, MRPL10, MRPL11, MRPL20, MRPL28, MRPL3, MRPS17, MRPS18, MRPS9, MST1, PET122, PET123, RSM22, SLS1, SWS2, YML6</i>
translational initiation	<i>AEP2, BUD27, CLU1, GCD1, GCD2, GCD6, GCD7, GCN3, GLE1, HYP2, NIP1, PAT1, PRT1, RLI1, RMD9, RPB7, RPG1, SCD6, SUI2, TIF4631, YGR054W</i>
RNA splicing	<i>BRR1, CWC2, CWC25, LSM3, LSM6, LSM8, MRS3, MSS116, PRP24, PRP39, PRP43, RDS3, SAD1, SEN2, SEN34, SLU7, SME1, SNP1, SNU13, SPP381, STP1</i>
DNA-dependent transcription, initiation	<i>DST1, GAL11, MED2, MED6, RPB7, RPB9, RPC17, RPC25, RPC31, RRN11, RRN3, RRN6, RRN7, SPT15, TAF11, TAF4, TAF5, TFA1, TFG1, TFG2, TOA1</i>

GO-Slim term	Genes annotated to the term
regulation of DNA metabolic process	<i>BDF1, CDC16, CSM3, ECO1, ELG1, FOB1, MET30, MPH1, PIF1, RAD3, RCO1, RPN4, RSC3, SET2, SFH1, SNF2, STB1, SWI3, TAH11, TBF1, TOP1</i>
conjugation	<i>BIK1, CLN2, DSE1, FYV5, KSS1, LSG1, MPS3, PEA2, RGA2, SCP160, SCW10, SPA2, SPT3, SSF1, SSF2, STE12, STE18, STE20, STE50, STE7</i>
regulation of protein modification process	<i>ACM1, ADA2, BUR2, CLB6, CLN1, CLN2, DBF4, NUP60, PCL1, PHO80, PSE1, PTC2, SCM3, SET2, SLN1, SSK1, STE20, STE7, SWE1</i>
protein acylation	<i>ADA2, AHC1, ARD1, ECO1, EPL1, HAT1, HFI1, HIF1, MAK3, MDM20, NAT2, NAT3, NGG1, PFA3, RTT109, SET2, SPT3, SPT8, TAF5</i>
protein folding	<i>ALF1, CCT4, CCT6, CCT7, CHS7, CIN2, CNE1, CNS1, EGD1, EMC1, HSC82, PLP2, SCJ1, SHR3, SLP1, SNL1, SSA2, ZIM17</i>
telomere organization	<i>DEF1, ECO1, ELG1, GON7, HSC82, IES3, KAE1, MEC3, PIF1, RAD51, RAD57, RIF1, SLX5, SLX8, SUA5, SWD1, SWD3, TBF1</i>
transcription from RNA polymerase III promoter	<i>CKA1, DST1, GTR1, KNS1, PZF1, RPB8, RPC11, RPC17, RPC19, RPC25, RPC31, RPC37, RPC40, RPC82, RPO26, RPO31, SPT15</i>
pseudohyphal growth	<i>DFG10, DIG2, DSE2, EMP70, FKH2, KSP1, NCS2, PEA2, RGA2, SFL1, SNF1, SPA2, SPT3, STE12, STE20, STE7, TMN3</i>
endocytosis	<i>ART5, BRE4, CSR2, DNF2, FEN2, FKS1, HES1, KES1, LSB5, OSH7, PKH1, SLG1, SVL3, UBC1, VPS33, YAP1802, YCK2</i>
DNA-dependent transcription, termination	<i>DST1, GRC3, HMT1, ISW2, NRD1, NSI1, PCF11, PTA1, PTI1, RAT1, REB1, REF2, RNT1, RPA12, RPB3, RPC11</i>
response to osmotic stress	<i>HSP12, ISC1, MOT3, MSB2, MSN2, PTC2, SHO1, SIS2, SLG1, SLN1, SSK1, STE20, STE50, TUP1, USV1, YPD1</i>
snoRNA processing	<i>DIS3, MTR4, NRD1, PAP2, POP1, POP3, POP4, POP6, POP8, PTI1, REF2, RPR2, RRP40, RRP42, RRP43, TRF5</i>
cell budding	<i>ATC1, AXL2, BOI2, CBK1, ERV15, GIC1, GIC2, GIN4, KCC4, PEA2, REI1, RGA2, RSR1, SOG2, URM1</i>
ribosomal subunit export from nucleus	<i>ARB1, BUD23, CRM1, ECM1, LSG1, NOG1, NOG2, NOP9, NUP1, RIX1, RIX7, RLI1, RNA1, RRS1, TIF6</i>
response to heat	<i>GLE2, HSP12, MSN2, NMA111, NUP100, NUP2, NUP42, NUP60, NUP84, SHO1, SLG1, STE20, STE50, WSC2, WSC3</i>
lipid transport	<i>CSR1, DNF2, HES1, KES1, LEM3, MDM34, MUP1, OSH7, PDR16, PRY2, PRY3, RFT1, SAM37, STE20</i>
generation of precursor metabolites and energy	<i>ADH1, CYC1, GDB1, GDS1, HAP3, IDH1, MBR1, MIC17, NDE1, PDC2, PET9, RMD9, SDH3, SLS1</i>
invasive growth in response to glucose limitation	<i>DIG2, DSE1, EMP70, KSS1, NCS2, RGA2, SFL1, SNF1, SPT3, STE12, STE20, STE7, TMN3, URM1</i>
nucleus organization	<i>APQ12, BIK1, BRL1, GLE2, NDC1, NEM1, NET1, NUP170, NUP57, NUP84, POM34, SNL1, SYH1</i>
translational elongation	<i>CTK1, EFB1, GCD11, HYP2, RPL31A, RPL31B, RPP1B, RPS2, RPS23A, RPS23B, RPS9B, SUA5, TEF4</i>
response to starvation	<i>AFT1, ATG27, CLG1, COG4, GEA2, KSP1, MSN2, PCL1, PHO4, PHO80, SNF1, SNF2</i>
vesicle organization	<i>ATG27, BOS1, GEA2, GLO3, PEP5, SEC12, SEC31, SEC9, SSO2, UBC1, VPS33, YKT6</i>
vitamin metabolic process	<i>ECM31, ISA1, MIS1, PDC2, PET18, RIB2, RIB7, RKI1, SNZ2, SPE2, SPE4, THI21</i>

GO-Slim term	Genes annotated to the term
amino acid transport	<i>AVT1, AVT3, BAP2, CAN1, FEN2, GNP1, HIP1, MUP1, TAT1, VBA2, YPQ1, YPQ2</i>
response to oxidative stress	<i>CTT1, EOS1, GCY1, GRX4, HCM1, HSP12, MCR1, MSN2, OCA1, SIT4, URM1</i>
sporulation	<i>CHS3, DON1, FMP45, ISC10, LSG1, MSS4, SET2, SMK1, SPT3, SSO2, SWS2</i>
cellular respiration	<i>CYC1, GDS1, HAP3, IDH1, MBR1, MIC17, PET9, RMD9, SDH3, SLS1</i>
regulation of transport	<i>AFT1, BRE5, FKS1, GLE2, PEP5, RHO3, SEC12, SLG1, TUP1, VPS33</i>
protein dephosphorylation	<i>CDC14, CDC55, FCP1, PHO8, PPH3, PPT1, PPZ1, PTC2, SAT4, TFG1</i>
membrane fusion	<i>BOS1, PEP5, PFA3, SEC9, SSO2, UGO1, VPS33, VTC3, VTC4, YKT6</i>
vacuole organization	<i>ATG27, ENV9, PEP5, PFA3, STE20, VPS33, VTC3, VTC4, YKT6</i>
protein alkylation	<i>BUR2, EFM2, HMT1, HPM1, LGE1, SET2, SWD1, SWD3, TRM112</i>
endosomal transport	<i>EMP70, OSH7, PEP5, RTT10, STP22, TDA3, YPT32, YPT6</i>
organelle fusion	<i>BIK1, BOS1, PEP5, SEC9, SSO2, UGO1, VPS33, YKT6</i>
protein lipidation	<i>GAA1, GAB1, GPI14, GPI17, PER1, PFA3, PGA1</i>
organelle inheritance	<i>ICE2, MDM20, MDM32, NAT3, RET2, STE20, YPT11</i>
exocytosis	<i>HES1, KES1, KIN2, OSH7, PEP5, RHO3, YPT32</i>
oligosaccharide metabolic process	<i>ALG1, MNN1, NTH1, SNF2, SWI3, TPS2, TSL1</i>
transposition	<i>ELG1, RAD3, RTT107, RTT109, SPT15, STE7</i>
protein maturation	<i>AFG3, ATG15, ATP23, ENV9, KEX1, MAS1</i>
peroxisome organization	<i>ATG27, ATG36, COG4, PEX31, SLG1, WSC3</i>
tRNA aminoacylation for protein translation	<i>FRS2, HTS1, MES1, MST1, TYS1</i>
cell morphogenesis	<i>BUD14, PEA2, SPA2, YCK2</i>
membrane invagination	<i>ATG15, VPS33, VTC3, VTC4</i>
can not be mapped to a GO slim term	<i>ALD5, BCD1, BSP1, CIA2, DAL3, DAL7, DDR2, EFR3, FHN1, FUR1, MET7, MRH4, NAF1, NNT1, PGA3, POL5, PSR2, PTK1, RFU1, RGL1, RRB1, RSF2, SHB17, SHQ1, TAH18, TEA1, URK1, VID22, WHI4, XBP1, YFH7, YML082W, YOL057W</i>