



**Untersuchungen zur Regulation des
TSC - Komplexes in *Schizosaccharomyces pombe***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie / Chemie

der Universität Osnabrück

von

Kerstin Schaubitzer

Osnabrück, Juli 2009

1.	Einleitung	1
1.1.	Der TOR - Signaltransduktionsweg in tierischen Zellen.....	1
1.1.1.	mTOR in tierischen Zellen	1
1.1.2.	Die AMP - aktivierte Kinase (AMPK) in tierischen Zellen	2
1.1.3.	TSC in tierischen Zellen	5
1.1.4.	Der TOR - Signaltransduktionsweg in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren in tierischen Zellen	7
1.1.5.	Der TOR - Signaltransduktionsweg in Abhängigkeit der Aminosäurekonzentration in tierischen Zellen	10
1.1.6.	Der TOR - Signaltransduktionsweg in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Glukose / Energie	13
1.1.7.	Weitere Funktionen / Interaktionspartner der TSC - Proteine in tierischen Zellen	16
1.1.7.1.	Die TSC - Proteine und die Regulation des Zellzyklus	16
1.1.7.2.	Interaktion zwischen TSC2 und den 14-3-3 Proteinen	17
1.1.7.3.	Der TSC - Komplex und die "Polyzystische Nierenerkrankung" (ADPKD)	18
1.2.	Der TOR - Signaltransduktionsweg in <i>S. pombe</i>	19
1.3.	Ziel dieser Arbeit.....	24
2.	Materialien und Methoden.....	26
2.1.	Materialien.....	26
2.1.1.	Stämme und Medien.....	26
2.1.1.1.	Hefestämme	26
2.1.1.1.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - Stämme	26
2.1.1.1.2.	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> - Stämme	26
2.1.1.1.3.	Medien zur Anzucht der Hefestämme.....	28
2.1.1.1.4.	Lagerung der Hefestämme	30
2.1.1.2.	<i>E. coli</i> - Stämme.....	30
2.1.1.3.	Medien zur Anzucht der Bakterienstämme.....	30
2.1.1.4.	Lagerung der Bakterienstämme	30
2.1.2.	Ausgangsplasmide.....	31
2.1.2.1.	Bakterienplasmide.....	31
2.1.2.2.	Hefepasmide	32
2.1.3.	Eigene Plasmidkonstruktionen	33
2.1.3.1.	Bakterienplasmide.....	33
2.1.3.2.	Hefepasmide	33
2.1.4.	Verwendete Oligonukleotide.....	34
2.1.5.	Verwendete Antikörper	37
2.1.6.	Verwendete Enzyme.....	37
2.2.	Methoden.....	37
2.2.1.	Transformationen	37
2.2.1.1.	Transformation von <i>E. coli</i> - Zellen.....	37
2.2.1.2.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> - Zellen	37
2.2.1.3.	Transformation von <i>S. pombe</i>	38
2.2.1.3.1.	Herstellung von <i>S. pombe</i> - Deletionsstämmen.....	38
2.2.1.3.2.	Konstruktion chromosomal kodierter Fusionsproteine	39
2.2.2.	Tetradenanalyse von <i>S. pombe</i> - Zellen.....	40
2.2.3.	Bestimmung der Paarungseffizienz von <i>S. pombe</i> - Zellen	40
2.2.4.	Test auf Zellwandstabilität von <i>S. pombe</i> - Zellen	40
2.2.5.	Erstellung serieller Verdünnungsreihen zur Wachstumsanalyse.....	41
2.2.6.	Präparation von DNA	41
2.2.6.1.	Isolierung von Plasmid - DNA aus <i>E. coli</i> mittels „Alkalische Lyse“	41
2.2.6.2.	Isolierung von Plasmid - DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.2.6.3.	Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarose - Gelen	42
2.2.6.4.	Reinigung von PCR - Fragmenten	42
2.2.6.5.	DNA - Fällung	43
2.2.7.	Enzymatische Modifikationen von DNA	43
2.2.7.1.	DNA-Restriktion.....	43

2.2.7.2.	Dephosphorylierung linearisierter DNA	43
2.2.8.	Ligationsreaktionen	43
2.2.9.	Auftrennung von DNA - Fragmenten mittels Gelelektrophoresen.....	43
2.2.9.1.	Auftrennung in nativen Agarosegelen	43
2.2.9.2.	Auftrennung von DNA - Fragmenten mittels Polyacrylamid - Gelen	44
2.2.10.	Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.10.1.	Amplifizierung von DNA	44
2.2.10.2.	Ortsspezifische PCR - Mutagenese mittels „overlap extension“	44
2.2.10.3.	Herstellung von DIG - markierten DNA - Sonden	45
2.2.11.	Bestimmung von DNA - Konzentrationen	45
2.2.12.	Sequenzierung von Plasmid - DNA.....	45
2.2.13.	RNA - Isolierung aus <i>S. pombe</i>	45
2.2.13.1.	Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA	46
2.2.13.2.	Qualitätskontrolle der isolierten RNA	46
2.2.14.	„Northern Blot“	46
2.2.14.1.	Agarose - Gelelektrophorese von RNA	46
2.2.14.2.	Kapillarblot	47
2.2.14.3.	Hybridisierung und Detektion der transferierten RNA	47
2.2.15.	Proteinanalytik.....	48
2.2.15.1.	Zellernte und - aufschluss zur Gewinnung von Hefe - Rohextrakten	48
2.2.15.1.1.	Gewinnung von Hefe - Rohextrakten zum Nachweis der phosphorylierten Form von Tsc1 und Tsc2 in <i>S. pombe</i>	48
2.2.15.1.2.	Gewinnung von Hefe - Rohextrakten zum Nachweis der phosphorylierten Form von Ssp2 und Ppk9 in <i>S. pombe</i>	49
2.2.15.2.	Proteinbestimmung nach der Bradford - Methode.....	49
2.2.15.3.	Immunpräzipitation von Proteinen.....	49
2.2.15.4.	Dephosphorylierung von Proteinen	50
2.2.15.5.	Untersuchung von Proteininteraktionen mittels Ko - Immunpräzipitation.....	50
2.2.15.6.	Präparation von subzellulären Fraktionen aus <i>S. pombe</i> - Zellen	50
2.2.15.7.	Nachweis spezifischer Proteine durch „Westernblot“ - Analyse.....	51
2.2.15.7.1.	SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese nach Laemmli (1970).....	51
2.2.15.7.2.	Transfer und Detektion der Proteine	51
2.2.15.8.	TAP - Reinigung von Tsc1 und Tsc2.....	52
2.2.15.8.1.	Herstellung von Hefe - Rohextrakten.....	52
2.2.15.8.2.	Reinigung von Tsc1- und Tsc2-TAP	53
2.2.15.8.3.	Silberfärbung.....	53
2.2.16.	Messung der Argininaufnahme mittels L-[³ H]-Arginin	53
3.	Ergebnisse.....	55
3.1.	Biochemische Charakterisierung von Tsc1 und Tsc2	55
3.1.1.	Posttranslationale Modifikationen von Tsc1 und Tsc2	55
3.1.2.	Nachweis der subzellulären Lokalisation von Tsc1 und Tsc2 mittels differentieller Zentrifugation	58
3.2.	Die AMP - aktivierte Kinase (AMPK) in <i>S. pombe</i>	60
3.2.1.	Identifizierung potentieller Untereinheiten der AMPK in <i>S. pombe</i>	60
3.2.2.	Konservierung des AMPK - Komplexes in <i>S. pombe</i>	62
3.2.2.1.	Zusammensetzung des AMPK - Komplexes in einer <i>ssp2Δ</i> - Mutante	63
3.2.3.	Zusammensetzung des AMPK - Komplexes in einer <i>ppk9Δ</i> - Mutante	65
3.2.4.	Untersuchungen zur Regulation der AMPK α	66
3.2.4.1.	Konservierung potentieller Phosphorylierungsstellen in der AMPK α	66
3.2.4.2.	Phosphorylierung von Ssp2 ^{T189} und Ppk9 ^{T178} unter verschiedenen Stressbedingungen	70
3.2.4.3.	Einfluss des SpTORC1 auf die Phosphorylierung von Ssp2 ^{T189}	72
3.2.5.	Phänotypische Auswirkungen einer Deletion der Untereinheiten der AMPK in <i>S. pombe</i>	73
3.2.6.	Komplementationsanalyse von <i>S. cerevisiae</i> - und <i>S. pombe</i> - Stämmen mit fehlender AMPK α - Untereinheit.....	76

3.2.6.1.	Komplementation einer <i>snf1Δ</i> - Mutante durch die Expression des <i>ssp2⁺</i> - Gens ...	76
3.2.6.2.	Komplementation einer <i>ssp2Δ</i> - Mutanten durch die Expression des <i>SNF1</i> - Gens	77
3.2.7.	Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges auf das Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen in einer <i>ssp2Δ</i> - Mutante	78
3.2.8.	Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges auf die Argininaufnahme in einer <i>ssp2Δ</i> - Mutante	81
3.2.9.	Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges auf die sexuelle Differenzierung einer <i>ssp2Δ</i> - Mutante	82
3.2.10.	Untersuchungen zur Expression durch Stickstofflimitation induzierter Gene	84
3.2.11.	Verbindung von Ssp2 zum TSC / TOR - Signalweg	86
3.2.11.1.	Phänotypische Auswirkungen einer <i>ssp2⁺</i> - Deletion in einer temperatursensitiven <i>tor2</i> - Mutante	86
3.2.11.2.	Einfluss einer <i>ssp2⁺</i> - Deletion auf das langsame Wachstumsverhalten der <i>tscΔ leu1-32</i> - Mutanten.....	88
3.2.12.	Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges in einer <i>ppk9Δ</i> - Mutante	90
3.3.	Identifizierung neuer Tsc1 - oder Tsc2 - bindender Proteine in <i>S. pombe</i> mittels der „TAP“ - Reinigung	91
4.	Diskussion	93
4.1.	Funktionelle und biochemische Charakterisierung von Tsc1 und Tsc2 in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	93
4.2.	Die AMP - aktivierte Kinase (AMPK) in <i>S. pombe</i>	96
4.2.1.	Konservierung der AMPK - Komplexe.....	96
4.2.2.	Konservierung potentieller Phosphorylierungsstellen in Ssp2 und Ppk9.....	99
4.2.3.	Zusammensetzung des AMPK - Komplexes I bzw. des AMPK -Komplexes II in einer <i>ppk9Δ</i> - bzw. <i>ssp2</i> - Mutante in Antwort auf Stickstofflimitation.....	101
4.2.4.	Funktionelle Charakterisierung der potentiellen Untereinheiten der AMPK	102
4.2.4.1.	Funktionelle Charakterisierung der AMPK α_1 Ssp2.....	102
4.2.4.2.	Funktionelle Charakterisierung der AMPK α_2 Ppk9	107
4.2.4.3.	Funktionelle Charakterisierung der AMPK β SPCC1919.03c und der AMPK γ Cbs2	108
4.2.5.	Komplementationsanalyse von <i>S. cerevisiae</i> - und <i>S. pombe</i> - Stämmen mit fehlender AMPK α - Untereinheit.....	109
4.3.	Die Einordnung von Ssp2 innerhalb des TOR - Signalweges	110
4.4.	Identifizierung neuer Wechselwirkungspartner des Tsc1 - und des Tsc2 - Proteins....	117
5.	Zusammenfassung	119
6.	Summary.....	120
7.	Abkürzungsverzeichnis	121
8.	Anhang	124
9.	Literaturverzeichnis	129
	Lebenslauf	146
	Danksagung.....	147
	Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung	148

1. Einleitung

Die Anwesenheit von Nährstoffen spielt eine fundamentale Rolle zum Überleben eukaryotischer und prokaryotischer Zellen. Insbesondere die Anpassung des Zellwachstums an sich ändernde intra- und extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren, Aminosäurekonzentrationen und dem zellulären Energielevel bedarf eines effektiven Regulationssystems. In Säugern und *Drosophila* ist bekannt, dass der TSC - Komplex sowohl Nährstoffinduzierte als auch Wachstumsfaktor - induzierte Signale über den TOR - Signaltransduktionsweg integriert.

1.1. Der TOR - Signaltransduktionsweg in tierischen Zellen

1.1.1. mTOR in tierischen Zellen

TOR kodiert für eine Serin / Threonin - Kinase der PIKK - Familie (phosphoinositide 3-kinase-related kinase) und wurde zuerst in *S. cerevisiae* als ein Protein identifiziert, welches in mutierter Form eine dominante Resistenz gegenüber dem Immunsuppressivum Rapamycin vermittelt (Heitman *et al.*, 1991; Kunz *et al.*, 1993). In Säugern inhibiert Rapamycin zelluläre Prozesse über die Bindung von FKBP12 (FK506-binding protein). Dieser Komplex bindet die so genannte FRB - Domäne (FKBP12-rapamycin binding), welche in Nachbarschaft der TOR - Kinasedomäne lokalisiert ist. Durch diese Bindung wird mTOR in seiner Kinaseaktivität *in vitro* komplett, *in vivo* teilweise inhibiert (Peterson *et al.*, 2000). Das mTOR - Protein existiert in zwei funktionell getrennten Komplexen, mTORC1 und mTORC2, wobei mTORC1 den am besten untersuchten TOR - Komplex darstellt. Während sich der mTORC1 aus mTOR, Raptor und mLST8 zusammensetzt, bildet mTOR mit Rictor, Sin1 und mLST8 den mTORC2 (Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Sarbassov *et al.*, 2004, Hara *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2006; Frias *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Der Rapamycin - sensitive mTORC1 steuert das Zellwachstum zeitlich über die Initiation der Transkription und Translation (s. 1.1.4 - 1.1.6). Hingegen reguliert der Rapamycin - insensitive mTORC2 das räumliche Wachstum der Zellen einschließlich der Regulation des Aktinzytoskelettes (Sarbassov *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2004). Der mTORC2 scheint nicht ausschließlich in die Regulation des Aktinzytoskelettes involviert zu sein. Neben der Regulation des Aktinzytoskelettes wurde auch eine Regulation der Kinase Akt (Sarbassov *et al.*, 2005) und der Regulation des Insulin - Signalweges durch den mTORC2 nachgewiesen (Ryu *et al.*, 2009).

Die Aktivität der beiden TOR - Komplexe wird durch verschiedene Signalkaskaden in Antwort auf Wachstumsfaktoren (Insulin), Nährstoffen (Aminosäuren, Glukose) und den intrazellulären Energiespiegel reguliert. So resultiert die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren in einer Aktivierung des mTORC1 durch die negative Regulation des TSC - Komplexes über die Kinasen Akt und Erk (1.1.4). Ebenso die Anwesenheit von Aminosäuren (speziell Leucin) resultiert in einer positiven Regulation der Aktivität des mTORC1 (1.1.5). Dahingegen führt eintretender Energiemangel zu einer Inaktivierung des mTORC1 - Signalweges durch die AMP - aktivierte Kinase (AMPK) direkt oder indirekt über den TSC - Komplex (1.1.6). Neueren Untersuchungen zufolge existiert neben der negativen Regulation des mTORC1 durch den TSC - Komplex ein weiterer Regulator des mTORC1 (James *et al.*, 2009). In dieser Studie wurde NF2/Merlin (neurofibromatosis 2) als negativer Regulator

des Zellwachstums unabhängig vom Akt-TSC / Erk-TSC - Signalweg identifiziert. Daneben konnte in weiteren Studien ein weiterer Regulator des mTORC1, Follikulin (FLCN), identifiziert werden (Hartman *et al.*, 2009a; Baba *et al.*, 2008; Baba *et al.*, 2006). Dabei ist jedoch nicht genau klar, ob FLCN als positiver oder negativer Regulator des mTORC1 fungiert. Einerseits führte der Verlust des für FLCN - kodierenden Genes *BHD* zu einer erhöhten Aktivität des mTORC1 (Baba *et al.*, 2006). Andererseits konnte gezeigt werden, dass sowohl eine verminderte Expression als auch der Verlust von *BHD* in einer deutlichen Abnahme der Aktivität des mTORC1 resultierte (Hartman *et al.*, 2009a). Die Gruppe um Hartman *et al.* (2009a) spekuliert, dass die erste Reaktion auf den Verlust des *BHD* - Genes in einer Inhibierung des mTORC1 resultiert, jedoch das anschließende Ereignisse, welche assoziiert mit der Entwicklung von Tumoren sind, zu einer Aktivierung des mTORC1 führt. Übereinstimmend mit dieser Vermutung ist die Studie von Baba *et al.* (2008). Obwohl hier eine negative Regulation des mTORC1 durch FLCN postuliert wurde, konnte eine erhöhte Aktivität der Akt - und Erk - Signalkaskade verzeichnet werden, was wiederum in einer erhöhten Aktivität des mTORC1 resultierte. Über die Regulation des mTORC2 ist zurzeit nicht viel bekannt. Kürzlich konnte auch dem TSC - Komplex eine Rolle in der Regulation der Aktivität des mTORC2 zugeordnet werden (Pollizzi *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2008).

1.1.2. Die AMP - aktivierte Kinase (AMPK) in tierischen Zellen

In fast allen eukaryotischen Zellen ist die 5'-AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen ATP - generierenden und ATP - verbrauchenden Prozessen zuständig. Die AMPK ist als Heterotrimer aktiv und setzt sich aus einer katalytischen (α) sowie zwei regulatorischen (β , γ) Untereinheiten zusammen. Homologe der für die α - Untereinheiten des AMPK - Komplexes kodierenden Gene konnten in fast allen eukaryotischen Spezies (Ausnahme: *Encephalitozoon cuniculi*) nachgewiesen werden (Hardie *et al.*, 2003; Miranda-Saavedra *et al.*, 2007). Ebenso konnten in *Drosophila*, *S. cerevisiae* und *S. pombe* Homologe der für die β - und γ - Untereinheiten kodierenden Gene identifiziert werden (Pan and Hardie, 2002; Gao *et al.*, 1996; Woods *et al.*, 1996; Matsusaka *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1995; Carling *et al.*, 1994; Mitchelhill *et al.*, 1994; Alderson *et al.*, 1991; Anderberg *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1994). Hierbei weisen die Untereinheiten des AMPK - Komplexes in allen Spezies ähnliche Domänenstrukturen auf (Hardie *et al.*, 2006) (Abb. 1.1). Die Struktur der katalytischen α - Untereinheit enthält am N- Terminus eine Serin- / Threoninreiche Region. Innerhalb dieser Region ist der Threoninrest 172 konserviert, welcher essentiell für die Aktivierung und Funktion der AMPK α ist (Hawley *et al.*, 1996). In Säugern führt eine Hemmung der ATP - Synthese (z.B. Hypoxie) oder ein beschleunigter ATP - Verbrauch (z.B. Muskelkontraktionen) zu einer eintretenden Energielimitation. Ein steigendes AMP / ATP - Verhältnis führt schließlich zur Aktivierung der AMPK (Inoki *et al.*, 2003; Dennis *et al.*, 2001; Abb. 1.2 A). Die Zunahme an intrazellulären AMP führt zur Bindung von AMP an die „Bateman domains“ der γ - Untereinheit. Dies führt einerseits zur Phosphorylierbarkeit des T172 der katalytischen Untereinheit

durch eine oberhalb der AMPK agierenden Kinase (Hawley *et al.*, 2003), andererseits zu einer Abnahme der Dephosphorylierbarkeit des T172, vermutlich durch die PP2C - Phosphatase (Davies *et al.*, 1995; Sanders *et al.*, 2007). Diese Phosphorylierung ist absolut notwendig für die Aktivierung der AMPK α (Hawley *et al.*, 1996). Eine somit funktionell aktiv vorliegende AMPK vermittelt die Aktivierung katabolischer Stoffwechselwege und gleichzeitig die Inaktivierung der Biosynthese von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden. Zusätzlich führt eine aktivierte AMPK zum Abschalten des Zellwachstums und der Zellentwicklung (zur Übersicht: Hardie, 2007). In Abhängigkeit der Verfügbarkeit intrazellulärer Energie in Form von ATP moduliert AMPK die Aktivität des mTORC1 - Signalweges direkt oder indirekt über den TSC - Komplex (1.1.6). ATP konkurriert mit AMP um die Bindung an die "bateman domains". Hohe Konzentrationen an intrazellulären ATP führen somit zu einer Verdrängung des gebundenen AMP und dadurch zu einer Inaktivierung der AMPK (Suter *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 1995; Corton *et al.*, 1995).

Die Struktur der β - Untereinheit enthält eine N-Isoamylase-Domäne, durch die der AMPK - Komplex Glykogen binden kann (Hudson *et al.*, 2003; Polekhina *et al.*, 2003). Jedoch ist bis jetzt die funktionelle Bedeutung der Glykogenbindung unklar.

Die C-terminale Region der α - Untereinheit bindet an die regulatorischen Untereinheiten β und γ (Crute *et al.*, 1998). Des Weiteren ist ebenfalls die C-terminale Region der β - Untereinheit für die Bildung des AMPK - Komplexes erforderlich. Während für die α - und β - Untereinheiten eindeutig gezeigt werden konnte, dass die C-terminale Region für die Bildung des AMPK - Komplexes erforderlich ist, existieren zwei Modelle für die Bindung der γ - Untereinheit an die α - und / oder β - Untereinheit. In Abwesenheit der katalytischen Untereinheit sind die β - und die γ - Untereinheiten in der Lage, miteinander zu interagieren (Dyck *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie, dass erst nach Ko - Expression der AMPK α die β - und γ - Untereinheiten miteinander interagieren (Wong and Lodish, 2006).

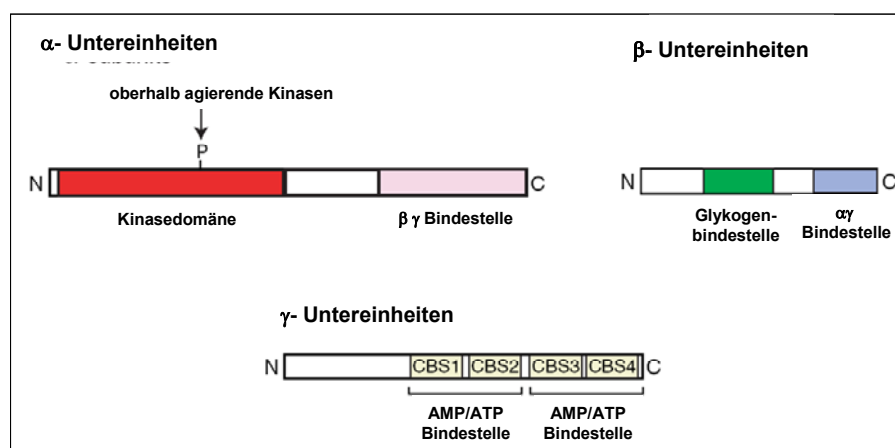


Abbildung 1.1: Allgemeine Domänenstruktur der α -, β - und γ -Untereinheiten der AMP - aktivierten Kinasen (AMPK). CBS1: cystathione β -synthase domain 1. Aus Hardie *et al.* (2006).

In Säugern war lange Zeit die Identität der Kinasen, die für die Aktivität der AMPK notwendige Phosphorylierung am essentiellen Threonin der α - Untereinheit vermitteln, unbekannt. Erst durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* konnten die für die Phosphorylierung der AMPK α zuständigen Proteinkinasen identifiziert werden. Eine genomweite Suche identifizierte Sak1 (Snf1-activating kinase-1), Elm1 (elongated morphology-1) und Tos3 (target of Sbf3) als die Kinasen, die Snf1 phosphorylieren und aktivieren (Nath *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2003; Sutherland *et al.*, 2003). Obwohl keine eindeutigen Homologe von Sak1, Elm1 und Tos3 im menschlichen Genom identifiziert werden konnten, ist deren Kinasedomäne stark mit denen aus der Proteinkinase LKB1, der TAK1 und den beiden Calmodulin - abhängigen Proteinkinase Kinasen CaMKK α und CaMKK β verwandt. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass LKB1, CaMKK α und CaMKK β T172 innerhalb der AMPK α phosphorylieren und damit *in vivo* aktivieren (Hurley *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2005, 2006; Hawley *et al.*, 2003, 2005; Woods *et al.*, 2003, 2005; Shaw *et al.*, 2004). Zudem sind LKB1, TAK1 und die CaMKKs in der Lage, die Snf1 / AMPK aus *S. cerevisiae* *in vitro* zu phosphorylieren und zu aktivieren (Shaw *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005) (Abb. 1.2 B).

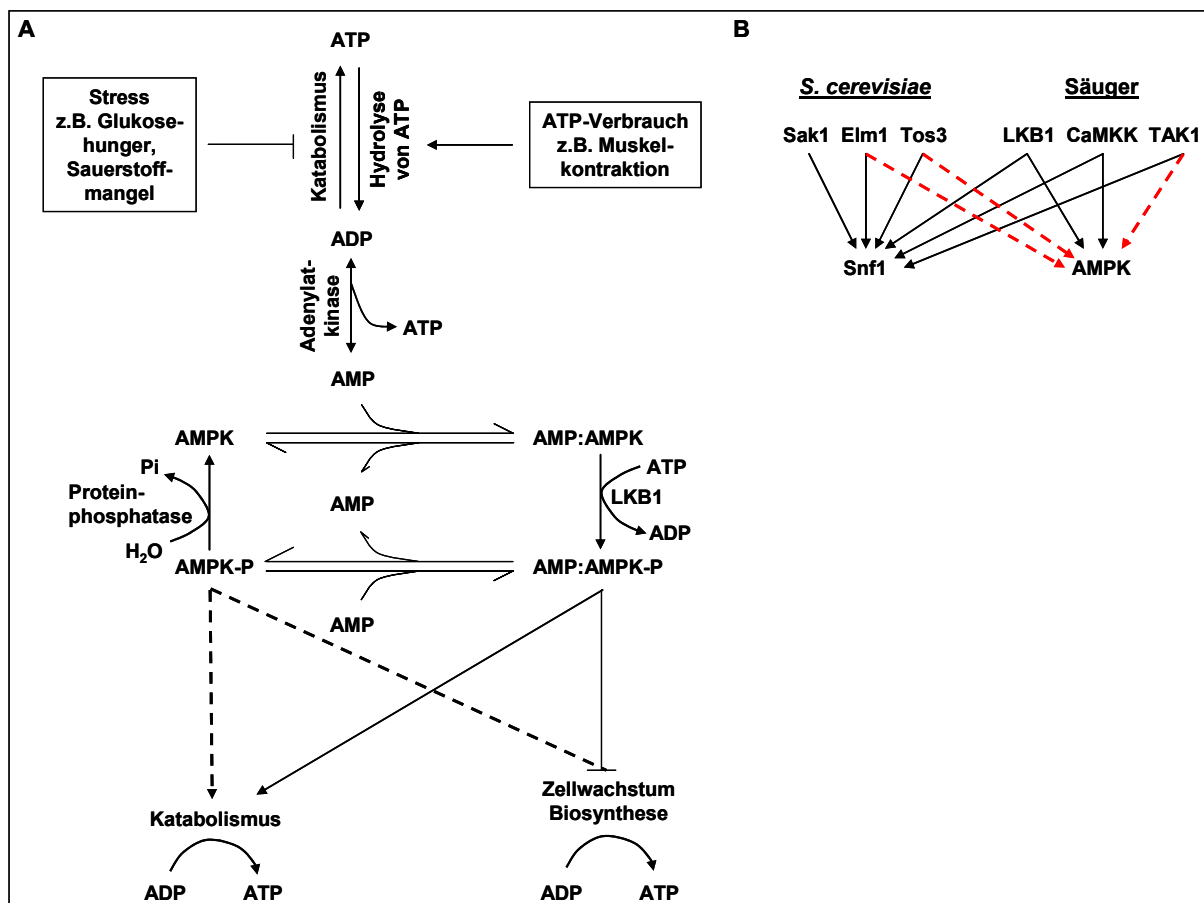


Abbildung 1.2: Regulatorischer Mechanismus der AMPK. **A:** Regulation der Energie - Homeostase durch die AMPK in Säugern. Aus Hardie *et al.* (2005), Erklärungen siehe Text. **B:** Konservierung oberhalb agierender Kinasen der SNF1 / AMPK. Rot gestrichelte Pfeile zeigen die Aktivierung der Snf1 / AMPK *in vitro*.

1.1.3. TSC in tierischen Zellen

Tuberöse Sklerose (TSC) ist eine autosomal dominante Erkrankung, die durch die Ausbildung einer Vielzahl von gutartigen Tumoren und durch schwerwiegende neurologische Erkrankungen (Autismus, Epilepsie) charakterisiert ist. Mutationen im *TSC1* - oder im *TSC2* - Gen sind die Ursache für die Ausbildung der Tuberösen Sklerose. Das *TSC2* - Gen kodiert für ein Protein (Tuberin), das eine GTPase aktivierende Domäne (GAP) enthält. Das *TSC1* - Gen kodiert für ein Protein (Hamartin), welches eine potentielle „coiled - coil“ Domäne enthält (van Slegtenhorst *et al.*, 1998). In nachfolgenden Studien konnte gezeigt werden, dass die Genprodukte TSC1 und TSC2 sowohl in Säugern als auch in *Drosophila* ein Heterodimer bilden (Plank *et al.*, 1998; van Slegtenhorst *et al.*, 1998; Potter *et al.*, 2001). Studien in verschiedenen Organismen (Säuger, *Drosophila*) demonstrierten, dass TSC1 und TSC2 nicht nur im Komplex vorliegend zelluläre Funktionen ausüben. So führte zwar eine Deletion von *TSC1* zu einer ähnlichen, aber nicht identischen Tumorbildung im Vergleich zu der *TSC2*^{-/-} - Mutante in Mäusen (Kobayashi *et al.*, 2001; Onda *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). Genetische und proteomische Analysen demonstrierten weiterhin, dass die *TSC* - Gene verschiedene zelluläre Prozesse regulieren (Rosner *et al.*, 2005; Hengstschläger *et al.*, 2005).

Der große Durchbruch im Verständnis der physiologischen Funktion des TSC - Komplex gelang mittels genetischer Studien in *Drosophila*. In drei voneinander unabhängigen genetischen „Screens“ für Regulatoren des Organwachstums wurde *dTsc1* als jenes Gen identifiziert, dessen Verlust zu übermäßigem Wachstum des Auges resultierte (Gao *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2001; Tapon *et al.*, 2001). Die Zunahme im Organwachstum der *dtsc1* - Mutante basierte dabei auf einer erhöhten Zellproliferation und einer starken Zunahme der Zellgröße. Auch die Deletion von *dTsc2* führt zu einer Zunahme der Zellgröße (Tapon *et al.*, 2001). Wurden *dTsc1* und *dTsc2* überexprimiert, konnte eine dramatische Abnahme der Organ- und Zellgröße verzeichnet werden. Dies konnte nicht beobachtet werden, wenn nur eines der Gene überexprimiert wurde (Gao *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 2001; Tapon *et al.*, 2001). Diese genetischen Daten machten deutlich, dass *dTsc1* und *dTsc2* als eine funktionelle Einheit agieren und in der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation involviert sind.

Die Interaktion von TSC1 und TSC2 wird durch verschiedene Phosphorylierungsereignisse sowie über die Ubiquitinierung von TSC2 reguliert. TSC1 stabilisiert den TSC - Komplex durch die Inhibierung der HERC1 Ubiquitin - Ligase (Chong-Kopera *et al.*, 2006), wohingegen die Bindung von FIP200 (focal adhesion kinase [FAK] family interacting protein of 200 kDa) an TSC1 vermutlich zu einer Dissoziation des TSC - Komplexes führt (Gan *et al.*, 2005). Ein weiteres TSC1 - Bindeprotein, TBC7, erhöht die Ubiquitinierung und Degradation von TSC2 (Nakashima *et al.*, 2007). In der Studie von Han *et al.* (2008) und Murthy *et al.* (2004) wurde Pam (protein associated with myc) als E3 - Ubiquitin - Ligase identifiziert, die die Ubiquitinierung von TSC2 vermittelt. Durch die Regulation des TSC - Komplexes über verschiedene Phosphorylierungsereignisse ist dieser in der Lage, Signale verschiedenster Signalwege zu integrieren und dann die Aktivität des mTORC1 zu

modulieren (Tabelle 1.1). Im Folgenden wird auf die verschiedenen Regulationsmöglichkeiten und Signalwege näher eingegangen werden.

Tabelle 1.1: Phosphorylierungsstellen von TSC1 und TSC2 *in vivo* durch bekannte Kinasen in Säugern.
Modifiziert nach Huang and Manning *et al.* (2008a).

Phosphorylierungsstellen	Kinase	vermutete Funktion	Quelle
TSC1 T417	CDK1	inhibierend	Astrinidis <i>et al.</i> , 2003
TSC1 S487	IKK β	inhibierend (Dissoziation des Komplexes?)	Lee <i>et al.</i> , 2007a
TSC1 S511	IKK β	inhibierend (Dissoziation des Komplexes?)	Lee <i>et al.</i> , 2007a
TSC1 S584	CDK1	inhibierend	Astrinidis <i>et al.</i> , 2003
TSC1 T1047	CDK1	inhibierend	Astrinidis <i>et al.</i> , 2003
TSC2 S540	ERK	inhibierend (Dissoziation des Komplexes?)	Ma <i>et al.</i> , 2005
TSC2 S664	ERK	inhibierend (Dissoziation des Komplexes?)	Ma <i>et al.</i> , 2005; Ma <i>et al.</i> , 2007
TSC2 S939	Akt/RSK1	inhibierend (Bindung von 14-3-3)	Manning <i>et al.</i> , 2002; Inoki <i>et al.</i> , 2002; Roux <i>et al.</i> , 2004; Rosner <i>et al.</i> , 2007
TSC2 S1130	Akt	inhibierend	Inoki <i>et al.</i> , 2002; Dan <i>et al.</i> , 2002
TSC2 S1132	Akt	inhibierend	Inoki <i>et al.</i> , 2002; Dan <i>et al.</i> , 2002
TSC2 S1254	MAPKAP Kinase-2	unbekannt (Bindung von 14-3-3)	Li <i>et al.</i> , 2003
TSC2 T1271	AMPK	aktivierend	Inoki <i>et al.</i> , 2003
TSC2 S1345	AMPK	aktivierend	Inoki <i>et al.</i> , 2003
TSC2 S1371	GSK3	aktivierend	Inoki <i>et al.</i> , 2006
TSC2 S1375	GSK3	aktivierend	Inoki <i>et al.</i> , 2006
TSC2 S1379	GSK3	aktivierend	Inoki <i>et al.</i> , 2006
TSC2 S1383	GSK3	aktivierend	Inoki <i>et al.</i> , 2006
TSC2 S1387	AMPK	aktivierend	Inoki <i>et al.</i> , 2003
TSC2 T1462	Akt/RSK1	inhibierend (Bindung von 14-3-3)	Manning <i>et al.</i> , 2002; Inoki <i>et al.</i> , 2002; Roux <i>et al.</i> , 2004; Rosner <i>et al.</i> , 2007
TSC2 S1798	RSK1	inhibierend	Roux <i>et al.</i> , 2004

In Antwort auf eine Vielzahl verschiedener Signale wie Wachstumsfaktoren, Nährstoffe (speziell Aminosäuren), osmotischer Stress und die Verfügbarkeit von Energie (verfügbares ATP) reguliert der TSC - Komplex die Aktivität des mTORC1 über die kleine GTPase Rheb (Ras homologue enriched in brain) negativ. In *Drosophila* stimuliert Rheb das Zellwachstum über TOR und S6K und agiert unterhalb der dTsc - Proteine (Patel *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2003; Stocker *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Biochemische Studien demonstrierten, dass sowohl in Säugern als auch *Drosophila* der TSC - Komplex direkt den mTORC1 inhibiert (Zhang *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003;

Castro *et al.*, 2003; Garami *et al.*, 2003). Über die GAP - Domäne innerhalb des TSC2 - Proteins stimuliert TSC2 im Komplex mit TSC1 die GTPase - Aktivität von Rheb durch die Überführung der GTP - gebundenen Form von Rheb in die GDP - gebundene Form (Zhang *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Im *et al.*, 2002). Ob in Säugern ein GEF (guanine-nucleotide exchange factor) existiert, der der GTPase - Aktivität des TSC - Komplexes entgegenwirkt, ist bislang nicht bekannt. Allerdings wird derzeit das „translational controlled tumour protein“ (TCTP) in *Drosophila* als mögliches Rheb - GEF diskutiert (Hsu *et al.*, 2007).

Obwohl genetische und biochemische Daten deutlich zeigen, dass die GTP - gebundene Form von Rheb den mTORC1 aktiviert, ist der molekulare Mechanismus noch nicht vollständig verstanden. In Überexpressionsstudien konnte gezeigt werden, dass Rheb mTOR bindet, wobei die Bindung zu mTOR vermutlich abhängig von der GTP - gebundenen Form von Rheb ist (Tee *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2005; Urano *et al.*, 2005). Ebenso stimuliert Rheb - GTP, jedoch nicht Rheb - GDP, die Kinaseaktivität des mTORC1 *in vitro* (Sato *et al.*, 2009; Sancak *et al.*, 2007). In einer weiteren Studie wurde beschrieben, dass Rheb direkt den FKBP12 Inhibitor FKBP38 bindet, wobei diese Interaktion stärker mit der GTP - gebundenen Form von Rheb vorliegt und die Aktivität des mTORC1 stimuliert (Bai *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu diesen Studien ist die Bindung von FKBP38 durch Rheb nicht essentiell für die Aktivität des mTORC1. Es scheint eher, dass Rheb die Bindung des mTORC1 mit seinen „downstream - Targets“ fördert und nicht die Kinaseaktivität des mTORC1 erhöht (Sato *et al.*; 2009).

1.1.4. Der TOR - Signaltransduktionsweg in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren in tierischen Zellen

Die Regulation der mTORC1 - Aktivität in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie beispielsweise Insulin involviert zwei verschiedene Signaltransduktionswege: den PI3K / Akt - Signalweg und den Ras - ERK - Signalweg (Abb. 1.3).

Akt kodiert für eine Serin / Threoninkinase, die den mTORC1 über die Inaktivierung des TSC - Komplexes positiv reguliert. Wachstumsfaktoren aktivieren die Phosphoinositid-3-kinase (PI3K), welches über eine Signalkaskade zur Phosphorylierung von Akt und damit zu dessen Aktivierung führt. PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) fungiert als negativer Regulator dieser Signalkaskade. In *PTEN*^{-/-} - Zellen wurde eine Hyperaktivierung des mTORC1 nachgewiesen (Han *et al.*, 2009; Neshat *et al.*, 2001; Podsypanina *et al.*, 2001). *PTEN* kodiert für eine Lipidphosphatase, die zur Abnahme der Phosphoinositid-3,4,5-Triphosphat - Konzentration führt, die für die Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran notwendig ist.

Unter unstimulierten Bedingungen weist der TSC - Komplex eine hohe spezifische GAP-Aktivität für die GTPase Rheb auf (Saucedo *et al.*, 2003; Stocker *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2003). Nach Stimulation der Zelle mittels Wachstumsfaktoren wird in Säugern TSC2 an verschiedenen Serin / Threoninresten durch Akt phosphoryliert (Tabelle 1.1). Zwei dieser Phosphorylierungsstellen, S939 und T1462, sind im *Drosophila* dTsc2 konserviert und werden ebenso phosphoryliert (Potter *et*

al., 2002). Biochemische Studien haben gezeigt, dass diese Phosphorylierung TSC2 in seiner Funktion inhibiert (Dan *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2002). Allerdings konnte kein Unterschied in der GAP - Aktivität des TSC - Komplexes von rekombinantem Rheb zwischen serumlimitierenden und Wachstumsfaktor - stimulierenden Zellen detektiert werden (Cai *et al.*, 2006). In Folge dessen scheint die durch Akt - vermittelte Hemmung von TSC2 in der Regulation auf einem alternativen Mechanismus zu basieren. Für die Inaktivierung von TSC2 über Akt wurden mehrere Mechanismen postuliert, einschließlich der Delokalisierung von TSC2 und der Dissoziation des TSC - Komplexes. In *Drosophila* wurde eine insulinstimulierte Dissoziation des TSC - Komplexes postuliert (Potter *et al.*, 2002). Eine nachfolgende Studie hingegen konnte keine Dissoziation des TSC - Komplexes durch die Akt - vermittelte Phosphorylierung nachweisen (Dong and Pan, 2004). Studien in Säugern wiesen ebenfalls keinen Effekt auf die Assoziation von TSC2 mit TSC1 auf (Manning *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2002). Eher scheint die Inaktivierung des TSC -Komplexes auf der Änderung der zellulären Lokalisation von TSC2 zu basieren. Cai *et al.* (2006) demonstrierten, dass die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Aktivierung der Akt zu einem erhöhten Level an zytoplasmatischen TSC2 führt, während TSC1 und Rheb vorwiegend an der Membran lokalisiert vorliegen.

Akt aktiviert den mTORC1 nicht nur durch die Inhibierung des TSC - Komplexes, sondern auch durch die Phosphorylierung des mTOR - Inhibitors PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) wird der mTORC1 aktiviert (Fonseca *et al.*, 2007; Oshiro *et al.*, 2007; Sancak *et al.*, 2007; Vander Haar *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung von PRAS40 in der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren resultiert in einer Disruption der Interaktion von PRAS40 mit mTOR und erhöht die Kinaseaktivität von mTOR (Vander Haar *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Die Aktivierung von mTORC1 führt zur Phosphorylierung des 4E - Bindeproteins (4E-BP) (Burnett *et al.*, 1998). Durch diese mTOR - abhängige Phosphorylierung wird das 4E-BP1 inaktiviert. Dies führt letztendlich zur Proteinbiosynthese und zum Zellwachstum. Ebenso phosphoryliert mTOR die S6K. Durch die Phosphorylierung von S6K wird deren Kinaseaktivität erhöht, was wiederum zu einer erhöhten Phosphorylierung von Proteinen führt, die mit der mRNA - Translation und ihrer Kontrolle assoziiert sind. Allerdings ist die Bedeutung der S6K bei der Regulation der Proteinbiosynthese noch unklar. In Zellen oder Geweben, in den *S6K* deletiert wurde, konnte nur ein kleiner oder gar kein Effekt auf die Proteinbiosynthese oder auf die Translation der 5'-TOP - enthaltenen mRNAs (terminal oligopyrimidine tract; Gesamtheit der für die translationalen Komponenten kodierenden mRNAs) verzeichnet werden (Ruvinsky *et al.*, 2005). Allerdings wurde durch zwei Arbeitsgruppen demonstriert, dass der stimulatorische Effekt von Insulin auf die Aktivierung der Translation der 5'-TOP-mRNAs durch die Deletion von *TSC* oder durch die Überexpression von Rheb imitiert werden kann (Patursky-Polischuk *et al.*, 2009; Bilanges *et al.*, 2007). Da in der Studie von Patursky-Polischuk *et al.* (2009) angedeutet wurde, dass die Insulin - abhängige Translation der 5'-TOP-mRNAs nicht nur über den Akt / TSC /mTOR - Signalweg stimuliert werden kann, wäre dies eine mögliche Erklärung

des minimalen Effektes einer *S6K* - Deletion auf die Translation der 5'-TOP-enhaltenen mRNAs. Jedoch wurden dazu noch keine Untersuchungen durchgeführt.

Die Behandlung von Säugerzellen mit Rapamycin resultierte des Öfteren in einer Zunahme der Sensitivität des PI3K / Akt - Signalweges zu Insulin, was eine negative Regulation des Insulin - Signalweges durch den mTORC1 andeutet. Diese negative Regulation ist in Zellen, die einen Verlust des TSC - Komplexes aufweisen, teilweise stärker ausgeprägt. Die hier vorliegende Hyperaktivierung des mTORC1 resultiert in einer starken Abschwächung des PI3K / Signalweges (Zhang *et al.*, 2007; Manning *et al.*, 2005; Shah *et al.*, 2004; Harrington *et al.*, 2004). Der durch den mTORC1 vermittelte negative „Feedback“ - Mechanismus basiert auf der Inhibierung der Funktion sowie der reduzierten Expression von IRS-1 und PDGFR (Harrington *et al.*, 2004), sowie auf den Effekt des TSC - Komplexes auf den TORC2. Die Aktivierung der PI3K geht mit der Rekrutierung der IRS - Proteine einher. Diese Rekrutierung stellt ein notwendiges Ereignis in der Aktivierung der PI3K in Anwesenheit von Insulin dar (Shepherd *et al.*, 1998). Folglich fördert der TSC - Komplex den Insulin - Signalweg durch die Reprimierung des negativen „Feedback“ - Mechanismus durch den mTORC1 und der S6K auf die Funktion / Expression von IRS1 und PDGFR (Zhang *et al.*, 2007; Harrington *et al.*, 2004). In Wildtypzellen dient dieser negative „Feedback“ - Mechanismus der Kontrolle und Limitierung des PI3K / Akt - Signalweges. In Zellen, die eine chronische Hyperaktivierung von mTORC1 aufweisen, wird diese Kontrolle inhibiert, einschließlich verschiedener Substrate von Akt, welche in das Überleben der Zelle und der Proliferation involviert sind. Ein ähnlicher „Feedback“ - Mechanismus konnte auch in *Drosophila* beschrieben werden. In *Drosophila* und Säugern stellt eines dieser Substrate FOXO (forkhead box O) dar (Harvey *et al.*, 2008; Kramer *et al.*, 2003). FOXO zählt zur Familie der Transkriptionsfaktoren, die normalerweise durch eine Akt - abhängige Phosphorylierung inhibiert und aus dem Nukleus translokalisiert werden (Harvey *et al.*, 2008). FOXO spielt eine Schlüsselrolle in der transkriptionellen Regulation verschiedener Gene, vermutlich durch die Stimulierung der Expression Wachstums - inhibierender Gene (Harvey *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006a). In Säugerzellen (Maus) wurde gezeigt, dass die FOXO - Proteine die Ausbildung von Tumoren begrenzen (Paik *et al.*, 2007). Ebenfalls in *Drosophila* sind die FOXO - Proteine in der Lage, dass durch den Verlust des TSC - Komplexes ausgelöste übermäßige Zellwachstum, zu begrenzen (Harvey *et al.*, 2008).

Zusätzlich zum PI3K / Akt - Signalweg existiert noch ein weiterer Signalweg, der die Aktivität des mTORC1 reguliert. So konnte gezeigt werden, dass neben dem PI3K/Akt - Signalweg auch der Ras - ERK - Signalweg in der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren die Aktivität des mTORC1 positiv reguliert. Die ERK - spezifische Aktivierung des mTORC1 basiert auf der Phosphorylierung des TSC - Komplexes durch die RSK (auch bekannt als: MAPKAP Kinase-1; mitogen-activated protein kinase-activated protein; Tabelle 1.1), welche durch ERK aktiviert wird (Tee *et al.*, 2003a; Roux *et al.*, 2004). Zudem weist die RSK eine mit der Akt - überschneidende Substratspezifität auf (Alessi *et al.*, 1996). Durch diese Phosphorylierung wird der TSC - Komplex als Rheb - GAP in seiner Funktion

inhibiert. Zusätzlich konnte die Gruppe um Ma *et al.* (2005) eine durch die MAP - Kinase (ERK1/2) vermittelte Phosphorylierung von TSC2 in der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren zeigen (Tabelle 1.1). Hier resultierte die Phosphorylierung von TSC2 durch ERK ebenfalls in einer Inaktivierung des TSC - Komplexes, basierend auf der Disruption der Interaktion zwischen TSC1 und TSC2.

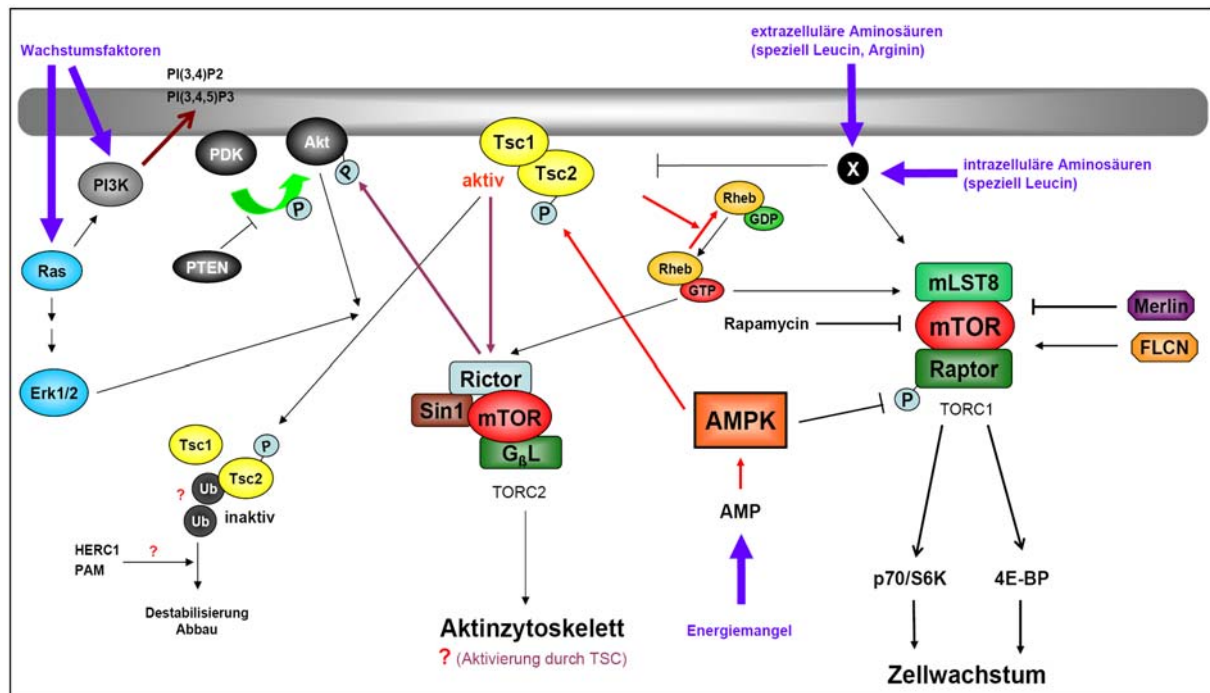


Abbildung 1.3: Vereinfachtes Modell der Kontrolle des Zellwachstums durch mTOR in tierischen Zellen. Der TSC - Komplex nimmt über die kleine GTPase Rheb Einfluss auf die Aktivität von mTORC1. Die Aktivierung des TSC - Komplexes durch die AMPK führt zu einer Inhibierung des Zellwachstums über den mTORC1. Dahingegen führt eine Inaktivierung des TSC - Komplexes durch die Phosphorylierung entweder durch Akt oder Erk1/2 zu einer Dissoziation des TSC - Komplexes. Infolgedessen werden die S6K1 und das 4EBP1 durch den mTORC1 phosphoryliert und so die Translation und das Zellwachstums initiiert.

1.1.5. Der TOR - Signaltransduktionsweg in Abhängigkeit der Aminosäurekonzentration in tierischen Zellen

Aminosäuren modulieren über die Koordination von verschiedenen Signaltransduktionswegen entscheidende zelluläre Prozesse, einschließlich der Proteinbiosynthese, Proteolyse, der Sekretion von Hormonen und den Transport / Metabolismus von Aminosäuren. Ein wichtiger Signalweg zur Regulation dieser Prozesse stellt unter anderem der mTOR - Signaltransduktionsweg dar. Allerdings ist der Mechanismus über den die Aminosäuren die Aktivität des mTORC1 modulieren noch nicht sehr gut untersucht. Zudem existieren verschiedene Ansichten in der Involvierung des TSC - Komplexes und der AMPK in der Regulation des mTORC1 durch die Anwesenheit / Abwesenheit von Aminosäuren.

Die ersten Hinweise, dass der TOR das Zellwachstum in Abhängigkeit der vorliegenden Aminosäurekonzentration reguliert, wurde erstmals durch die Gruppe um Hara *et al.* (1998) beschrieben. Das Entfernen der Aminosäuren aus dem Zellmedium für 1 - 2 h resultierte in einer selektiven Inhibierung der S6K und der Dephosphorylierung des 4E-BP1. Zudem ist der Bedarf an

Aminosäuren dominant über die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (Hara *et al.* (1998). Dies suggeriert einen Akt - unabhängigen Mechanismus der Regulation der mTORC1 - Aktivität in der Anwesenheit von Aminosäuren (Sarbasov *et al.*, 2005). In *Drosophila* wurde erstmals im Jahr 2000 eine Beteiligung von dTOR an der Regulation des Zellwachstums in Abhängigkeit von Aminosäuren gefunden. Hierbei führt der Verlust der dTOR - Funktion zu einem Arrest der Larvenentwicklung und der Ausprägung von Phänotypen wie beispielsweise eine signifikante Reduzierung der nuklearen Größe, Aggregation von Vesikeln im Fettkörper der Larve und einem zelltypspezifischen Arrest des Zellzyklus. Diese Phänotypen zeigen sich auch bei Aminosäurelimitation (Oldham *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000).

Die funktionelle Aktivität von mTORC1 scheint direkt oder durch einen Effektor, unabhängig vom TSC - Komplex, reguliert zu werden (Suryawan *et al.*, 2008; Roccio *et al.*, 2006; Nobukini *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). In diesen Studien resultierte die Aminosäurelimitierung in *TSC^{-/-}* - Zellen nur in einer minimalen Inhibierung der S6K. Allerdings konnte in anderen Studien eine Abnahme der mTORC1 - Aktivität in *TSC^{-/-}* - Zellen, wenn diese für Serum und allen Aminosäuren limitiert wurden, beschrieben werden. Es ist möglich, dass diese verschiedenen Beobachtungen durch den in den *TSC^{-/-}* - Deletionen ausgelösten hohen Level an Rheb - GTP gegeben ist. Eine große Anzahl von Studien konnte demonstrieren, dass die Überexpression von *RHEB* den Effekt der Aminosäurelimitation auf die Aktivität des mTORC1 aufheben kann (Smith *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2005; Saucedo *et al.*, 2003; Stocker *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Garami *et al.*, 2003). Allerdings existieren auch hier widersprüchliche Daten, ob sich der Level an Rheb - GTP in Antwort auf Aminosäurelimitation ändert (Roccio *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2005; Nobukini *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2003). Zurzeit ist es nicht möglich, die durch den TSC - Komplex induzierte Änderung des Verhältnisses an Rheb - GDP / GTP zuverlässig nachzuweisen. Obwohl Rheb vermutlich notwendig ist, um das Signal der Anwesenheit von Aminosäuren an den mTORC1 zu vermitteln, ist nicht geklärt, ob Rheb an der Wahrnehmung der Aminosäurekonzentration selbst beteiligt ist. Es ist also möglich, dass weitere Signalwege existieren, welche die Anwesenheit von Aminosäuren wahrnehmen und dieses Signal an mTORC1 vermitteln. Verschiedene Studien haben die Involvierung der PI3K und VPS34 (vacuolar protein sorting) in die Aktivierung des mTORC1 in Abhängigkeit der Aminosäurekonzentrationen postuliert (Nobukini *et al.*, 2005; Byfield *et al.*, 2005). Kürzlich konnten die so genannten Rag - Proteine (Ras-related GTPase) in die durch Aminosäuren ausgelöste Stimulierung der mTORC1 - Aktivität beschrieben werden (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). In Säugern existieren vier für die Rag - Proteine kodierenden Gene, während das Genom von *Drosophila* für zwei Rag - ähnliche Proteine kodiert. Die Deletion der *Rag* - Gene sowohl in *Drosophila* als auch in Säugern resultierte in einer verminderten Aktivierung des mTORC1 in Anwesenheit von Aminosäuren. Ebenfalls führte die Überexpression der konstitutiv vorliegenden RagA - GTP - gebundenen Form zu der Unfähigkeit des mTORC1 auf eine eintretende Aminosäurelimitation zu reagieren (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). Allerdings ist auch hier

noch nicht vollständig verstanden, wie die Rag - Proteine den mTORC1 aktivieren. Es wird postuliert, dass die Rag - Proteine in der Lage sind, die subzelluläre Lokalisation des mTORC1 in Säugern zu modulieren (Sancak *et al.*, 2008). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass nach Stimulation der Zelle mit Aminosäuren der mTORC1 zu Rab7 - enthaltenen Vesikeln translokalisiert, in welchen der Aktivator des mTORC1 Rheb - GTP verweilt (Sancak *et al.*, 2008; Abb. 1.4). Diese Beobachtungen stellen auch eine sehr gute Erklärung der zuvor beschriebenen Widersprüche dar. Im Falle der nur minimal beobachteten Inhibierung der S6K in Antwort auf Aminosäurelimitation in den *TSC^{-/-}* - Zellen liegt zwar ein erhöhter Level an Rheb - GTP vor, jedoch ist der mTORC1 nicht in den Rab7 - enthaltenen Vesikeln lokalisiert und es findet keine Aktivierung des mTORC1 in der Anwesenheit von Aminosäuren statt (Sancak *et al.*, 2008).

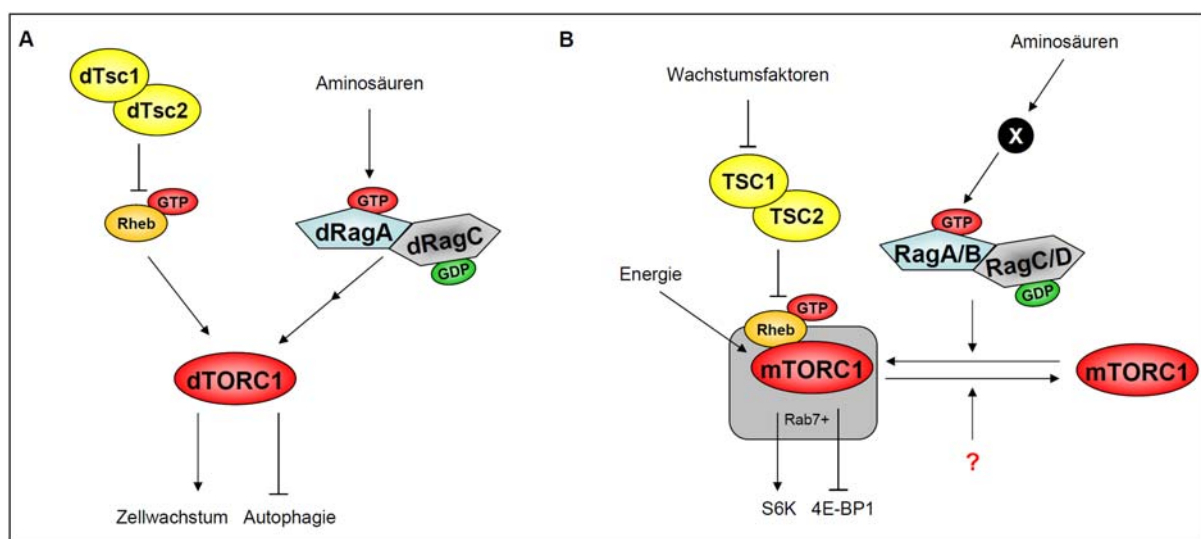


Abbildung 1.4: Postuliertes Modell der Kontrolle des TORC1 durch die Anwesenheit von Aminosäuren in tierischen Zellen. A: Genetische Studien in *Drosophila* weisen daraufhin, dass die dRag - Proteine parallel oder oberhalb der GTPase dRheb agieren, um die Aktivität des mTORC1 zu regulieren. **B:** In Säugern regulieren die Rag - Proteine die subzelluläre Lokalisation des mTORC1 in Antwort auf die Verfügbarkeit von Aminosäuren. Modifiziert nach Sancak and Sabatini (2009).

Der Entzug der verschiedenen Aminosäuren für 1 - 2 h resultiert in einer Inaktivierung des mTORC1. Hierbei führt das Fehlen der Aminosäure Leucin oder Arginin im Vergleich zu den anderen Aminosäuren (z. B. Histidin, Threonin, Phenylalanin oder Lysin) zu einem stärker ausgeprägten inhibitorischen Effekt des mTORC1 (Hara *et al.*, 1998). Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass Leucin die Proteinbiosynthese im Skelettmuskel sowie die Proteindegradation in Skelettmuskel und Leber über den mTORC1 reguliert (Suryawan *et al.*, 2008; Suryawan *et al.*, 2007; Vary, 2007; Escobar *et al.*, 2005; Anthony *et al.*, 2000). Obwohl der Effekt von Leucin auf die Aktivität des mTORC1 sofort nach Leucinaufnahme eintritt, ist noch nicht geklärt, ob Leucin die Aktivität des mTORC1 direkt, über eine kovalente Bindung an einen Liganden oder über ein metabolisches Zwischenprodukt reguliert. In einer Studie von Du *et al.* (2007) konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von AMPK α die Leucin - induzierte mTORC1 - Aktivierung aufhebt. Da zudem die Expression einer dominant negativen Form der AMPK α in einer abgeschwächten Stimulation der

mTORC1 - Aktivität durch Leucin führte, schlossen die Autoren, dass Leucin den mTORC1 über die Inhibierung der AMPK α stimuliert (Pruznak *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2007; Bolster *et al.*, 2002). Pruznak *et al.* (2008) schlossen die Involvierung des TSC - Komplexes in der Regulation des mTORC1 durch die AMPK α in der Anwesenheit von Leucin aus. Die durch AICAR (Aktivator der hmAMPK) vermittelte Leucinresistenz resultierte in keiner erhöhten Phosphorylierung des TSC2 - Proteins durch die AMPK α . Diese Studie steht jedoch im Widerspruch mit der von Suryawan *et al.* (2008). Zwar konnte hier auch keine Beteiligung des TSC - Komplexes an der Leucin - abhängigen Regulation des mTORC1 beschrieben werden, allerdings wurde auch keine Beteiligung der AMPK an der Regulation des mTORC1 durch Leucin nachgewiesen. Diese beschriebenen Widersprüche demonstrierten, dass zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Leucin - abhängigen (Aminosäuren allgemein) Regulation des mTORC1 zwingend weiterführende Studien notwendig sind.

1.1.6. Der TOR - Signaltransduktionsweg in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Glukose / Energie

Die Aktivität von mTOR wird nicht nur durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren oder von Aminosäuren reguliert. Der intrazelluläre Energielevel spielt bei der Regulation des Zellwachstums über den mTORC1 ebenfalls eine entscheidende Rolle. Eintretender Energiemangel, ausgelöst durch die Zugabe des Glukoseanalogons 2-Desoxyglukose (2-DOG), führt zu einer Hemmung der Phosphorylierung von S6K und 4E-BP1. Außerdem konnte gezeigt werden, dass TSC2 ebenfalls durch den intrazellulären Energielevel reguliert wird. Unter ATP - Mangel wird TSC2 von der 5'-AMP - aktivierten Proteinkinase (AMPK) phosphoryliert und damit in seiner Funktion als negativer Regulator des mTORC1 verstärkt (Inoki *et al.*, 2003a; Abb. 1.3 + 1.5).

In tierischen Zellen stellt die Serin- / Threoninkinase LKB1 die Hauptproteinkinase der AMPK α unter Energiemangel dar. Mutationen in dem Tumorsuppressorgen *LKB1* führen zur Ausbildung des so genannten Peutz-Jeghers-Syndroms (PJS) im Menschen (Hemminki *et al.*, 1998). Interessanterweise wurden für das PJS mehrere klinische Symptome beschrieben, die auch für das durch eine inaktive Form des Tumorsuppressors PTEN ausgelöste Cowden-Syndrom charakteristisch sind. Diese Übereinstimmung in den Phänotypen könnte in einer möglichen negativen Regulation des PI3K / Akt - Signalweges, ähnlich der von PTEN, begründet liegen. Während in *LKB1* - defizienten Zellen der klassische PI3K / Akt - Signalweg nicht beeinflusst wird, führt ein Fehlen der *LKB1* zu einer Hyperaktivierung des mTOR - Signalweges (Corradetti *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2004a). In höheren Eukaryoten wird die Phosphorylierung des 4EBP1 und der S6K durch den mTORC1 in Abhängigkeit von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Wird dem Medium 2-DOG zugefügt, ist eine Inhibierung der mTOR - vermittelten Phosphorylierung des 4EBP1 und der S6K zu verzeichnen (Dennis *et al.*, 2001). Da mTOR *in vitro* eine hohe K_m (~1 mM) gegenüber ATP besitzt, wird vermutet, dass mTOR zusätzlich als ATP - Sensor zur Regulation der Translationsinitiation unter physiologischen Bedingungen fungiert. Da jedoch ATP in der Zelle keinen großen Schwankungen unterliegt, muss noch ein weiterer Faktor existieren, der zur Inhibierung des mTORC1 unter

energielimitierenden Bedingungen führt. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die AMPK α über den mTORC1 die Aktivität der S6K moduliert (Bolster *et al.*, 2002; Kimura *et al.*, 2003; Krause *et al.*, 2002). Trotz der Anwesenheit von Aminosäuren, welche zu einer Aktivierung des mTORC1 führt, überwiegt die Aktivierung der AMPK α resultierend aus der Inhibierung des ATP - Stoffwechsels mittels AICAR (Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleosid). Ebenso führt die Behandlung der Zellen mit 2-DOG zu einer Aktivierung der AMPK α und in Folge zu einem reduzierten Level der durch den mTORC1 phosphorylierten S6K (Jiang *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2005; Horman *et al.*, 2002). Zwar ist nach Aktivierung der AMPK α durch niedrige Konzentrationen an 2-DOG (10 mM) eine abnehmende Proteinbiosynthese, ausgelöst durch die Inhibierung des Elongationsfaktors eEF2, zu verzeichnen, jedoch keine Änderung in der Phosphorylierung der S6K und des 4EBP1 (Smith *et al.*, 2005; Horman *et al.*, 2002). Erst eine stark erhöhte Konzentration an 2-DOG (100 mM) führt zu einer Inhibierung der mTOR - abhängigen Phosphorylierung der S6K und in einer stark abnehmenden Proteinbiosynthese durch die aktivierte AMPK α . Die S6K wird durch den aktiven mTORC1 phosphoryliert und liegt aktiv vor. Die Aktivierung der S6K resultiert in der Phosphorylierung und Inaktivierung der eEF2 - Kinase, welche den Elongationsfaktor eEF2 phosphoryliert und inhibiert (Wang *et al.*, 2001). Jedoch kann die vorliegende Inhibierung der Proteinbiosynthese über den Elongationsfaktor eEF2 sowohl durch niedrige als auch hohe 2-DOG - Konzentrationen nicht alleinig durch den mTOR - abhängigen Signalweg begründet werden. Eine Inhibierung von mTOR durch Rapamycin führt zu einer Abnahme der Proteinbiosynthese nur um 20% (Dubbelhuis and Meijer, 2002). Somit scheint unter schwach energielimitierenden Bedingungen eine mTOR - unabhängige Regulation der Proteinbiosynthese durch die AMPK vorzuliegen. Infolgedessen scheint eEF2 unabhängig von der Aktivität des mTORC1 unter Energiemangel durch die AMPK α phosphoryliert. AMPK α ist in der Lage, den Elongationsfaktor eEF2 *in vitro* zu phosphorylieren, auch wenn nur eine niedrige Zunahme der Phosphorylierung durch die AMPK α verzeichnet werden konnte (Horman *et al.*, 2002). Jedoch könnte dieser Effekt die verminderte Proteinbiosynthese unabhängig von der S6K unter niedrigen 2-DOG - Konzentrationen erklären. Zum anderen wäre dies auch eine Erklärung für die stark verminderte Proteinbiosynthese im Vergleich zu der Inhibierung des mTORC1 durch Rapamycin (Smith *et al.*, 2005; Horman *et al.*, 2002). Smith *et al.* (2005) konnten zudem zeigen, dass auch der TSC -Komplex in den durch 2-DOG ausgelösten Energiemangel involviert ist. Weitere Studien demonstrierten, dass die AMPK α ihre inhibierende Wirkung auf den mTORC1 über den TSC - Komplex vermittelt. AMPK phosphoryliert TSC2 an verschiedenen Aminosäureresten (Tabelle 1.1). Durch die Substitution der Aminosäurereste T1227 und S1345 zu Alanin konnte eine Abnahme in der Phosphorylierung von TSC2 nachgewiesen werden. Ausgehend von dieser Beobachtungen phosphoryliert aktiviertes AMPK α TSC2 an T1227 und S1345 und verstärkt damit den TSC - Komplex in seiner Funktion als negativer Regulator des mTORC1 unter energielimitierenden Bedingungen (Inoki *et al.*, 2003a; Abb. 1.5). Des Weiteren resultiert eine Aktivierung der AMPK α in einer verminderten Phosphorylierung des 4EBP1 in Wildtypzellen, jedoch

nicht in *TSC2^{-/-}* - Zellen (Smith *et al.*, 2005). Ebenso führt die Behandlung der *TSC2^{-/-}* - Zellen mit 2-DOG zu keiner Änderung der durch den mTORC1 vermittelten Phosphorylierung von S6K. Im Gegensatz dazu wurde in *TSC2^{+/+}* - Zellen eine starke Abnahme in der Phosphorylierung von S6K beobachtet (Smith *et al.*, 2005).

Zusätzlich wird die Aktivität von TSC2 über den Wnt - Signalweg moduliert. Der Wnt - Signalweg reguliert eine Vielzahl zellulärer Funktionen, einschließlich des Zellwachstum, der Zellproliferation und der Zellentwicklung (Moon *et al.*, 2004; Wodarz and Nusse, 1998). Durch die Wnt - Signalkaskade wird die Glykogensynthetase GSK3 inhibiert, was zur Hyperphosphorylierung des β - Catenin führt. Dieses wird in Folge in den Nukleus transloziert und induziert die Expression einer Vielzahl von Genen, einschließlich des für das Cyclin D kodierende Gen und dem Wachstumsfaktor VEGF (Easwaran *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001; Tetsu and McCormick, 1999). In der Studie von Inoki *et al.* (2006) konnte TSC2 als ein physiologisches Substrat der Glykogensynthetase GSK3 identifiziert werden. Allerdings ist die Phosphorylierung und Aktivierung von TSC2 durch GSK3 abhängig von der Aktivität der AMPK α . TSC2 kann nur durch GSK3 phosphoryliert werden, wenn es am S1345 durch die AMPK α phosphoryliert vorliegt (Inoki *et al.*, 2006). Ebenso benötigt AMPK α GSK3, um den mTORC1 unter Energielimitation über den TSC - Komplex zu inhibieren. Die Behandlung von *GSK3^{-/-}* - Zellen mit 2-DOG resultierte zwar in der gleich starken Phosphorylierung der AMPK α im Vergleich zu *GSK3^{+/+}* - Zellen, jedoch war die durch 2-DOG - induzierte Phosphorylierung der S6K und von 4E-BP1 teilweise beeinträchtigt (Inoki *et al.*, 2006). In der Studie von Zhang *et al.* (2006) konnte zudem gezeigt werden, dass über die S6K ein „Feedback“ - Mechanismus der Aktivität der GSK3 existiert. Unter Bedingungen, in denen die durch Wachstumsfaktoren - stimulierte Aktivierung der Akt unterbrochen ist (*TSC2^{-/-}* - Zellen), ist S6K in der Lage, GSK3 zu phosphorylieren und somit zu inhibieren.

TSC2^{-/-} - Zellen sind immer noch in der Lage, sich an energielimitierende Bedingungen zu adaptieren, wenn auch in geringerem Maße als Wildtypzellen (Gwinn *et al.*, 2008; Abb. 1.5). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass noch weitere Substrate für die AMPK α existieren müssen, die die Aktivität von mTORC1 direkt oder indirekt beeinflussen. Diese Annahme identifizierte Raptor als weiteres Substrat der AMPK (Gwinn *et al.*, 2008). Die AMPK α - abhängige Phosphorylierung von Raptor ermöglicht die Bindung von 14-3-3 und führt dadurch zu einer Inhibierung des mTORC1 und zu einem durch Energiemangel induzierten Zellzyklusarrest. 14-3-3 Proteine regulieren die Aktivität vieler Substrate entweder durch allosterische Stabilisierung oder durch Bildung eines für die Funktion des Substrates nachteiligen Komplexes (Yaffe, 2002). Raptor ist in der Lage über den N- Terminus die S6K in die räumliche Nähe von mTOR zu bringen und so die Phosphorylierung der S6K durch mTOR zu ermöglichen (Nojima *et al.*, 2003). Durch die Bindung von 14-3-3 an Raptor wird vermutlich diese Eigenschaft von Raptor gestört und in Folge liegt der mTORC1 inaktiv vor.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die AMPK mTOR am T2446 phosphoryliert (Abb. 1.5). Die Aktivierung der AMPK α durch AICAR führte zu einer zunehmenden Phosphorylierung des T2446

von mTOR (Cheng *et al.*, 2004). Bis jetzt ist unbekannt, ob diese Phosphorylierung einen Effekt auf die katalytische Aktivität der mTOR - Kinase oder auf die Interaktion von mTOR mit seinen regulatorischen Proteinen wie beispielsweise Raptor oder Rheb ausübt.

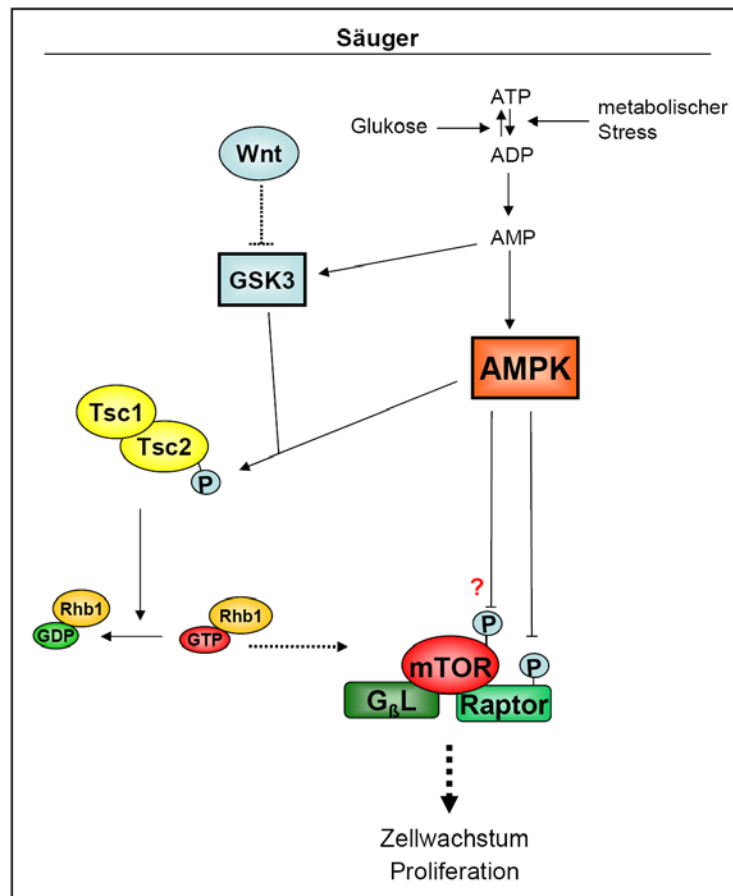


Abbildung 1.5: Interaktionen von AMPK und mTORC1 in Säugern. Modifiziert nach Hardie *et al.*, 2008.

1.1.7. Weitere Funktionen / Interaktionspartner der TSC - Proteine in tierischen Zellen

Bis heute konnten über 50 Proteine identifiziert werden, welche mit TSC1 und/oder TSC2 interagieren (zur Übersicht: Rosner *et al.*, 2008). Viele dieser Proteine stehen im Zusammenhang mit der Regulation der Aktivität des TSC - Komplexes und dem TOR - Signaltransduktionsweg. Auf einige soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

1.1.7.1. Die TSC - Proteine und die Regulation des Zellzyklus

Die Abfolge des Zellzyklus wird durch drei verschiedene Proteinklassen, die Cycline, die Cyclin - abhängigen Kinasen (CDKs) und den CDK - Inhibitoren reguliert. Die Cycline D1, D2 und D3 werden während der frühen G₁ - Phase exprimiert und aktivieren ihre Interaktionspartner CDK4 und CDK6. Cyclin E bindet und aktiviert CDK2, um den Übergang von der G₁ - in die S - Phase zu vermitteln. Ebenfalls Cyclin A aktiviert CDK2, um zusätzlich die DNA - Replikation zu kontrollieren. Der Übergang von der G₂ - Phase in die mitotische Phase wird durch die Komplexe CDK1 / Cyclin B und CDK1 / Cyclin A reguliert. Die Inhibitoren der Cyclin - abhängigen Kinasen teilen sich in zwei verschiedene Klassen auf. Die INK4 - Mitglieder (p15, p16, p18, p19) sind wichtige Regulatoren von

CDK4 und CDK6, die CIP / KIP - Mitglieder (p21, p27^{KIP1}, p57) regulieren die weiteren Cyclin - abhängigen Kinasen (zur Übersicht: Maddika *et al.*, 2007; Sherr, 2000).

TSC2 ist ein weiterer Regulator des Zellzyklus. Die verminderte Expression von *TSC2* resultiert in der Induktion des Zellzyklus und *TSC2*^{-/-} - Zellen weisen eine verkürzte G₁ - Phase auf (Soucek *et al.*, 2001; Soucek *et al.*, 1998). Die Überexpression von *TSC1* oder *TSC2* reguliert den Ablauf des Zellzyklus negativ, begleitet von zunehmend in der G₁ - Phase vorliegender Zellen und einer Zunahme des CDK - Inhibitor p27^{KIP1} (Miloloza *et al.*, 2000; Soucek *et al.*, 1997). TSC bindet den CDK - Inhibitors p27^{KIP1}. Durch diese Bindung wird die durch die E3 - Ubiquitin - Kinase (SKP2) vermittelte Ubiquitinierung und Degradation von p27^{KIP1} inhibiert (Rosner and Hengstschläger, 2004). Weiterhin induziert TSC2 die nukleäre Lokalisation von p27^{KIP1} (Rosner *et al.*, 2007a). Die durch die Akt - vermittelte Phosphorylierung am S939 und T1462 von TSC2 vermindert zwar die Fähigkeit von TSC2 im Komplex mit TSC1 den mTORC1 negativ zu regulieren, jedoch nicht die Regulation von p27^{KIP1} (Rosner *et al.*, 2007, 2007a). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Zelllinien (WI-38, MRC-5, IMR-90, MCF-7, SK-N-SH) der Proteinlevel von p27^{KIP1} mit dem Proteinlevel von TSC2 korreliert (Burgstaller *et al.*, 2009). In Zelllinien, in denen ein hoher Proteinlevel an TSC2 detektiert werden konnte, konnte auch ein erhöhter Proteinlevel an p27^{KIP1} beobachtet werden. Im Gegensatz zu der positiven Regulation von p27^{KIP1} durch TSC2, reguliert TSC2 die Cycline D1, D2 und D3 durch die Bindung von TSC2 an die D - Cycline negativ (Zacharek *et al.*, 2005). In dieser Studie resultierte die ektoische Expression der Komplexe D1 - CDK4 und D1 - CDK6 in einer erhöhten Phosphorylierung und in einer Abnahme des Proteinlevels von TSC1 und TSC2, welches wiederum zu einer Phosphorylierung der durch den mTORC1 - regulierten S6K und 4E-BP1 führte.

1.1.7.2. Interaktion zwischen TSC2 und den 14-3-3 Proteinen

14-3-3 Proteine stellen eine hoch konservierte Familie regulatorischer Moleküle dar, welche in allen eukaryotischen Zellen exprimiert werden (zur Übersicht: Obsilová *et al.*, 2008). Sie sind in der Lage an eine Vielzahl verschiedener Signalmoleküle, einschließlich Kinasen und Phosphatasen und an transmembrane Rezeptoren zu binden und deren Aktivität zu modulieren. In Säugern existieren sieben Isoformen von 14-3-3 Proteinen (β , ϵ , γ , σ , τ , ζ , η), welche alle TSC2 binden (Malanchuk *et al.*, 2005; Shumway *et al.*, 2003; Nellist *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Die Interaktion zwischen 14-3-3 an TSC2 ist phosphorylierungsabhängig, vermutlich über die Phosphorylierung von Akt (Nellist *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass die MAPK p38 zur Phosphorylierung am S1210 von TSC2 notwendig ist (Shumway *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2002). In Antwort auf Serum wird die MAPK p38 aktiviert und TSC2 durch diese am S1210 phosphoryliert, was in einer erhöhten Interaktion von TSC2 und 14-3-3 β resultiert (Li *et al.*, 2003). Im gleichen Jahr konnten Shumway *et al.*, (2003) zeigen, dass 14-3-3 β durch die Phosphorylierung am S1210 von TSC2 den TSC - Komplex bindet und einen heterotrimeren Komplex bildet. Da die Überexpression des 14-3-3 β Proteins in einer erhöhten Phosphorylierung der S6K über den TSC - Komplex resultierte, schlossen die Autoren, dass durch die Bindung von 14-3-3 β an TSC2 der TSC -

Komplex in seiner Funktion negativ reguliert wird. Durch die Interaktion zwischen TSC2 und den 14-3-3 Proteinen wird auch die Lokalisation von TSC2 kontrolliert (Cai *et al.*, 2006). In dieser Studie wurde gezeigt, dass TSC1 mit einer hyperphosphorylierten Form von TSC2 an der Zellmembran ko - lokalisiert, wo TSC2 im Komplex mit TSC1 seine Funktion als GTPase -aktivierendes Protein für Rheb ausübt. In Antwort auf Wachstumsfaktoren wird TSC2 von Akt phosphoryliert und ins Zytoplasma translokalisiert. Dies wiederum führt zur Interaktion zwischen TSC2 und den 14-3-3 Proteinen (Cai *et al.*, 2006). TSC2 in 14-3-3 gebundener Form ist nicht mehr in der Lage an TSC1 zu binden und in Folge das Zellwachstum über den mTORC1 negativ zu regulieren.

Sauerstoffmangel resultiert in einer Aktivierung von REDD1 und in Folge zu einer Inaktivierung des mTORC1 über den TSC - Komplex (Brugarolas *et al.*, 2004). Aktiviertes REDD1 zerstört die durch die Wachstumsfaktoren - vermittelte Assoziation des TSC2 - Proteins mit den 14-3-3 Proteinen (DeYoung *et al.*, 2008). In Folge ist TSC2 wieder in der Lage mit TSC1 zu interagieren und unter sauerstofflimitierenden Bedingungen die Aktivität des mTORC1, trotz der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren, zu inhibieren.

1.1.7.3. Der TSC - Komplex und die “Polyzystische Nierenerkrankung” (ADPKD)

Die autosomal dominante “Polyzystische Nierenerkrankung” (ADPKD) tritt mit einer Häufigkeit von 1:1000 auf, führt zur Bildung von Zysten in der Niere und im späteren Verlauf der Erkrankung ebenso in der Leber und im Pankreas sowie zu aortischen Aneurysmen (Wilson, 2004). 85 % der Fälle von ADPKD basieren auf Mutationen im *PDK1* - Gen, welches für das Polycystin 1 (PC1) kodiert. Die Funktion von Polycystin 1 wurde durch mehrere Studien in den Zusammenhang mit dem primären Zilium gestellt (Yoder *et al.*, 2002; Nauli *et al.*, 2003). *TSC2* und *PDK1* sind benachbarte Gene, wobei viele an TSC erkrankte Erwachsene ebenfalls die Bildung von Polyzysten in der Niere aufweisen. In diesem Fall wiesen die Patienten ausgedehnte *TSC2* - Deletionen auf, welche sich auf den 3' - Bereich des *PDK1* - Genes ausweiteten (Sampson *et al.*, 1997). Weitere Studien zeigten, dass *TSC2* mit der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne von PC1 ko - immunpräzipitierte, notwendig für die zytoplasmatische Lokalisierung von PC1 ist und ferner die Zysten der AKPKD - Patienten eine erhöhte Aktivität im TOR - Signaltransduktionsweg aufweisen (Shillingford *et al.*, 2006; Kleymenova *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass PC1 den mTOR - Signaltransduktionsweg über die Interaktion mit *TSC2* negativ reguliert (Chapman, 2007; Weimbs, 2006; Mostov, 2006). Im Gegensatz zu diesen Annahmen, wurde kürzlich gezeigt, dass die Funktion von *TSC2* sowohl von PC1 als auch von mTOR unabhängig ist (Hartman *et al.*, 2009). In dieser Studie lag *TSC1* im Basalkörper des primären Ziliums lokalisiert vor. Zudem wurde ein erhöhter Anteil an begeißelten Zellen in *TSC1*^{-/-} und *TSC2*^{-/-} im Vergleich zur Kontrollzelllinie nachgewiesen. Ebenfalls sind die Geißeln in den *TSC1*^{-/-} - und *TSC2*^{-/-} - deletierten Zellen länger als in Wildtypzellen. Diese verstärkte Geißelbildung konnte in Zellen, die mit Rapamycin behandelt wurden oder die für *PDK1* deletiert sind, nicht gezeigt werden. Entgegen den zuvor publizierten Daten wurde keine Verbindung zwischen mTOR und *PDK1* gefunden: lediglich ein kleiner Teil der AKPKD - Zysten

weist eine Phosphorylierung der S6 - Kinase auf, während in den restlichen AKPKD - Zysten nur eine minimale Aktivierung der S6 - Kinase durch mTOR nachgewiesen wurde (Hartman *et al.*, 2009). Ebenso wurde keine Aktivierung von mTOR in den *PDK1^{-/-}* - Zellen nachgewiesen. Diese Studie verknüpft die Funktion der TSC - Proteine mit dem primären Zilium, was einen neuen regulatorischen Mechanismus des primären Ziliums durch die TSC - Proteine suggeriert. Zudem demonstriert dies, dass die Tuberöse Sklerose unabhängig von der AKPKD mit einer verstärkten Entwicklung von haarförmigen Ausstülpungen (Zysten) assoziiert ist.

1.2. Der TOR - Signaltransduktionsweg in *S. pombe*

Zur Analyse von komplexen Signaltransduktionswegen stellen einzellige, eukaryotische Organismen, die eine kurze Generationszeit aufweisen und genetisch leicht manipulierbar sind, attraktive Modellorganismen dar. Obwohl die Hefe *S. cerevisiae* eines der bestuntersuchten Modellsysteme für die TOR - vermittelte Signaltransduktion ist, erscheint sie doch für zukünftige Studien als Modellorganismus weniger geeignet, da sie sich in wichtigen Schlüsselproteinen vom Säugersystem unterscheidet. So konnten in *S. cerevisiae* keine homologen Gene zu den TSC - Genen aus Säugern identifiziert werden (Abb. 1.6). Des Weiteren führt der Verlust des Rhb1 - Proteins zu keinem sichtbaren Wachstumsdefekt (Urano *et al.*, 2000) und scheint nicht regulierend auf Tor zu wirken (Aspuria and Tamanoi, 2004). Im Gegensatz dazu sind die Proteine des TSC / Rheb / TOR - Signalweges in *S. pombe* konserviert (Matsumoto *et al.*, 2002; Weisman and Choder, 2001; Kawai *et al.*, 2001; Mach *et al.*, 2000; Abb. 1.6). Daher scheint diese Hefe zur Untersuchung des TOR - Signaltransduktionsweges besser geeignet. Somit sollte die Übertragbarkeit neuer Erkenntnisse auf höhere Eukaryoten besser gewährleistet sein.

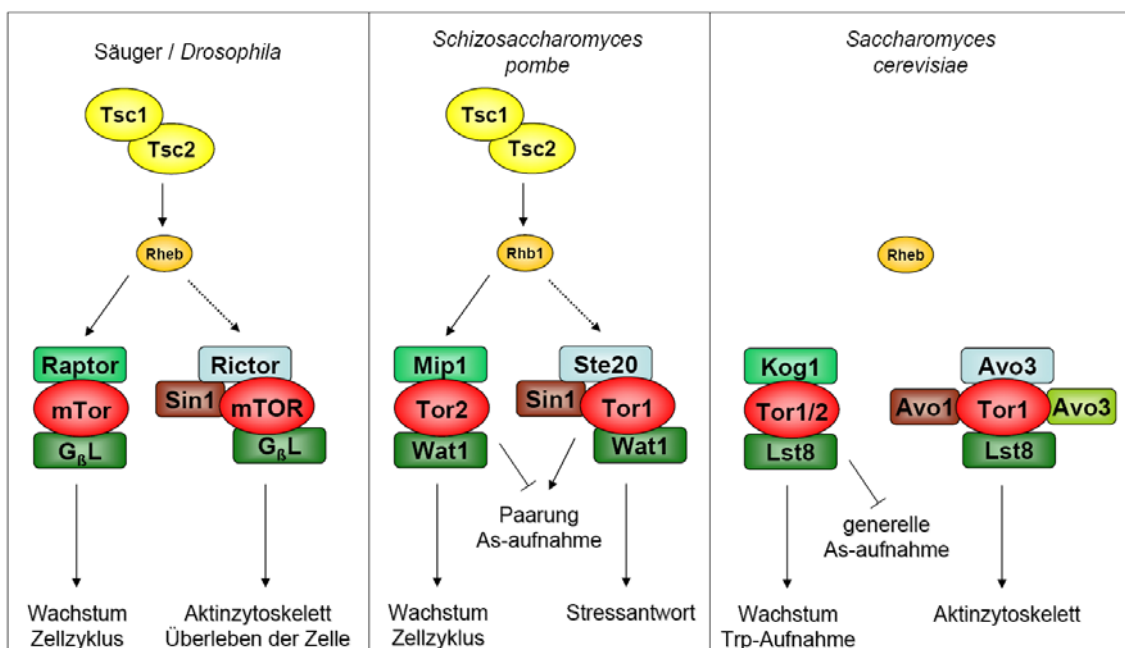


Abbildung 1.6: Der TSC / Rheb / TOR - Signalweg ist in Säugern, *Drosophila* und *S. pombe* konserviert, jedoch nicht in *S. cerevisiae*. Modifiziert nach Aspuria *et al.*, 2007.

Sowohl in Säugern als auch in *S. cerevisiae* kann Rapamycin spezifisch zur Inhibierung des Zellwachstums über den TORC1 eingesetzt werden (Petersen *et al.*, 2003; Kunz *et al.*, 1993; Heitman *et al.*, 1991). Im Gegensatz dazu übt Rapamycin in *S. pombe* keinen Einfluss auf das vegetative Zellwachstum aus (Weisman *et al.*, 1997). Allerdings konnte bei gleichzeitigem Stickstoffhunger eine Inhibierung der sexuellen Entwicklung, aber kein Eintritt in die stationäre Phase oder der Zellarrest in der G₁ - Phase verzeichnet werden (Weisman *et al.*, 1997). In *S. pombe* konnten zwei konservierte TOR - Proteine, Tor1 und Tor2, identifiziert werden (Kawai *et al.*, 2001; Weisman and Choder, 2001). Obwohl Rapamycin in *S. pombe* nicht das vegetative Zellwachstum inhibiert, weisen sowohl Tor1 als auch Tor2 die hoch konservierte FRB - Domäne auf, die mit dem FKBP12 - Rapamycin - Komplex interagiert (Kawai *et al.*, 2001; Weisman and Choder, 2001). Im Jahr 2001 konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des *fhk1*⁺ - Gens, welches für das homologe FKBP12 kodiert, zu einem Verlust der sexuellen Entwicklung nach Stickstofflimitation führt, gleich wie Rapamycin - behandelte Wildtypzellen (Weisman *et al.*, 2001). Interessanterweise zeigen für Leucin auxotrophe *tor1Δ* - Mutanten eine Rapamycin - Sensitivität (Weisman *et al.*, 2005). Diese Sensitivität konnte durch eine zusätzliche Deletion des *fhk1*⁺ - Gens supprimiert werden. Durch ein *tor1* - Allel, welches vermutlich zu einem Defekt in der Rapamycin - FKBP12 - Bindung führt, wird ebenfalls die Sensitivität der Leucin auxotrophen Mutanten gegenüber Rapamycin aufgehoben (Weisman *et al.*, 2005). Im Zuge der funktionellen Charakterisierung des Tor2 - Proteins wurde ebenfalls eine Rapamycin - Hypersensitivität einer *tor2*^{ts} - Mutante beschrieben (Hayashi *et al.*, 2007). Dieser Stamm wies eine Mutation in der Kinasedomäne von Tor2 auf. Trotz dieser Phänotypen der *tor*⁺ - Mutanten konnte die Bindung des Rapamycin - FKBP12 - Komplexes an die Tor - Proteine in *S. pombe* noch nicht nachgewiesen werden. Zudem ist bis jetzt noch nicht klar, warum vegetativ wachsende Zellen keinen Wachstumsdefekt in der Anwesenheit von Rapamycin aufweisen.

Gleich dem Säugersystem und der Hefe *S. cerevisiae* liegen Tor1 und Tor2 in *S. pombe* in zwei verschiedenen Komplexen, SpTORC1 und SpTORC2, vor (Hartmuth and Petersen, 2009; Hayashi *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2007; Alvarez and Moreno, 2006; G. von Coelln, persönliche Mitteilung). Der SpTORC1 wird durch das Tor2 - Protein zusammen mit Mip1 (Homologes von Raptor) und Wat1 (Homologes von Lst8) gebildet. Im Vergleich dazu wird der SpTORC2 durch das Tor1 - Protein zusammen mit Ste20 (Homologes von Rictor / Avo3), Wat1 und Sin1 (Homologes von Avo1 aus *S. cerevisiae*) gebildet. Zusätzlich konnten weitere Subkomplexe beschrieben werden. In der Studie von Matsuo *et al.* (2007) wurde erstmals Tor2 als eine Komponente des SpTORC2 (Tor2, Wat1, Ste20, Sin1) vermutet. Allerdings scheint diese Interaktion auf der Überexpression von Tor2 zu basieren. Jedoch interagiert in Minimalmedium Tor2 mit der SpTORC2 - Komponente Ste20 und liegt in Folge im SpTORC2 vor, wobei aber noch keine zelluläre Funktion von Tor2 im SpTORC2 gefunden wurde (Hartmuth and Petersen, 2009). In dieser Studie konnte zudem ein SpTORC1_B, bestehend aus Tor1, Wat1 und Mip1 beschrieben werden.

Die verschiedenen SpTORC üben unterschiedliche Funktionen in der Zelle aus (Abb. 1.7). Während der Verlust von *tor1*⁺ nicht essentiell ist, ist die Funktion des Tor2 - Proteins essentiell für das vegetative Zellwachstum (Kawai *et al.*, 2001; Weisman and Choder, 2001). Trotz der Beobachtung, dass *tor1*⁺ nicht essentiell ist, benötigen *tor1Δ* - Mutanten, welche für die Aminosäure Leucin auxotroph sind, zum Zellwachstum höhere Konzentrationen dieser Aminosäure (Weisman *et al.*, 2007; Weisman *et al.*, 2005). Die *tor1Δ* - Mutanten sind ebenfalls nicht fähig, unter verschiedenen Stressbedingungen (osmotischer Stress, hoher pH, oxidativer Stress) zu überleben (Kawai *et al.*, 2001; Weisman and Choder, 2001). Ebenso sind sie nicht in der Lage, bei Stickstoffhunger in der G₁ - Phase zu arretieren und weisen einen Verlust der sexuellen Entwicklung auf. Das *tor1*⁺ - Gen wurde als erforderliches Gen für das Auftreten des Phänotypes des *gad2-1* - Allels, durch welches die Zellen einen Defekt im G₁ - Arrest und den Verlust der sexuellen Differenzierung aufweisen, identifiziert (Matsuo *et al.*, 2003). In einem genetischen „Screen“ für Suppressoren des Phänotypes einer *gad2-1* - Mutation (*tor1-g2* - Mutante) konnte das *gad8*⁺ - Gen isoliert werden. Dieses Gen kodiert für die Serin- / Threoninkinase Gad8 und die *gad8Δ* - Mutante zeigt die gleichen Phänotypen wie eine *tor1Δ* - Mutante (Matsuo *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde zudem gezeigt, dass Tor1 die Kinaseaktivität von Gad8 mittels Phosphorylierung reguliert und das Gad8 für die Ausprägung der Phänotypen der *tor1*⁺ - Deletionsmutante benötigt wird.

Die Überexpression von *gad8*⁺ konnte sowohl die Temperatursensitivität als auch den Verlust der sexuellen Differenzierung der *tor1-g2* - Mutante supprimieren (Matsuo *et al.*, 2003). Nachfolgende Studien demonstrierten, dass SpTORC2 ebenfalls über die Aktivierung der Serin / Threoninkinase Gad8 sowohl den Übergang der G₁- in die S- Phase als auch den Übergang der G₂- Phase in die Mitose bei Stickstoffhunger negativ reguliert (Ikeda *et al.*, 2008; Petersen and Nurse, 2007). Im Gegensatz dazu führt Nährstoffstress beispielsweise durch Wachstum der Zellen in Minimalmedium mit schlecht verwertbarer Stickstoffquelle zu einem Vorliegen von Tor1 im SpTORC1_B (Hartmuth and Petersen, 2009). In diesem Komplex vorliegend reguliert Tor1 den Eintritt in die Mitose positiv.

Für Tor2 wurde ebenfalls eine kritische Rolle in der Regulation des Zellwachstums in Abhängigkeit von der Stickstoffkonzentration beschrieben. Trotz nährstoffreicher Bedingungen resultiert eine Hemmung von Tor2 in einer Arretierung der *S. pombe* - Zellen in der G₀/G₁ - Phase (Alvarez and Moreno, 2006; Uritani *et al.*, 2006; Weisman *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2007). Die phänotypische Überlappung einer Tor2 - Inaktivierung mit Zellen, denen der Stickstoff entzogen wurde, zeigt sich ebenfalls auf der Transkriptionsebene. So wurde eine verstärkte Expression der durch Stickstoffhunger induzierten Gene (*ste11*⁺, *isp6*⁺ und *fnx1*⁺) nachgewiesen (Matsuo *et al.*, 2007; Mach *et al.*, 2000; Tabancay *et al.*, 2003). Dahingegen blieb das Transkriptionsniveau der Gene, welche unter Glukosehunger exprimiert werden, unverändert. Ein weiterer Phänotyp der *tor2*^{ts} - Mutanten unter restriktiven Bedingungen stellt eine erhöhte Proteindegradation und den Verlust der sexuellen Differenzierung dar (Alvarez and Moreno, 2006; Uritani *et al.*, 2006).

Gleich dem Säugersystem konnte in *S. pombe* ein Gen, welches für das Homologe Rheb in Säugern kodiert, identifiziert werden (Mach *et al.*, 2000). Der Verlust des *rhb1*⁺ - Gens führt gleich der *tor2*⁺ - Deletion zum Zelltod. Mutanten, in denen die Funktion von Rhb1 inhibiert wurde, arretieren in der G₁ - Phase ähnlich einer Stickstofflimitation und weisen eine verstärkte Expression der durch Stickstoffhunger induzierten Gene (*ste11*⁺, *isp6*⁺ und *fnx1*⁺) auf (Matsuo *et al.*, 2007; Tabancay *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2001; Mach *et al.*, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass Rheb aus Säugern die Funktion von Rhb1 komplementieren kann (Yang *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgerten die Autoren, dass auch in *S. pombe* Rhb1 und Tor2 im selben Signalweg zur Aktivierung des Zellwachstums agieren (Abb. 1.7). Die physikalische Interaktion von Rhb1 mit Tor2 unterstreicht diese Vermutung (Uritani *et al.*, 2006; Urano *et al.*, 2005).

Das Genom von *S. pombe* enthält Gene mit signifikanten Ähnlichkeiten zu *TSC1* und *TSC2* und werden als *tsc1*⁺ und *tsc2*⁺ bezeichnet (Matsumoto *et al.*, 2002). Die GAP - Domäne des Tsc - Proteins ist mit 39% Identität zum menschlichen TSC2 Protein teilweise konserviert. Zudem konnte gezeigt werden, dass in *S. pombe in vivo* auch ein Tsc1 - / Tsc2 - Komplex existiert (van Slegtenhorst *et al.*, 1998; Matsumoto *et al.*, 2002). Jedoch liegen noch keine Untersuchungen zu seiner Regulation vor (Abb. 1.7). *S. pombe* Stämme, welche für *tsc1*⁺ und / oder *tsc2*⁺ deletiert sind, weisen unter Normalbedingungen (Vollmedium) keinen Wachstumsdefekt auf. Sind sie aber zusätzlich für die Aminosäuren Leucin, Adenin, Lysin, Uracil oder Histidin auxotroph, so benötigen sie zum Zellwachstum höhere Konzentration dieser Aminosäuren (Matsumoto *et al.*, 2002). Daraus kann auf einen Aufnahmedefekt sowohl für Aminosäuren als auch für Adenin und Uracil in den *tscΔ* - Mutanten geschlossen werden (Matsumoto *et al.*, 2002). Dieser Defekt basiert vermutlich auf der Fehllokalisierung der Aminosäurepermease *c359.03*⁺ (Matsumoto *et al.*, 2002). Normalerweise liegt die Aminosäurepermease *c3559.03*⁺ lokalisiert in der Plasmamembran vor. Jedoch akkumuliert diese in den *tscΔ* - Mutanten im Zytoplasma oder ist auf Vakuolen - ähnliche Strukturen begrenzt. Die Canavanin - Resistenz in den *tscΔ* - Mutanten unterstreicht diese Vermutung (van Slegtenhorst *et al.*, 2004). Zusätzlich konnte in den *tscΔ* - Mutanten eine verminderte Expression weiterer Aminosäurepermeasen und ein niedriger intrazellulärer Level an Alanin, Asparagin, Histidin, Glutamin, Ornithin, Citrullin und Arginin nachgewiesen werden (van Slegtenhorst *et al.*, 2004). Neuere Daten zeigten, dass eine *tsc1Δ* - und *tsc2Δ* - Mutante eine stark verringerte Aufnahme der basischen Aminosäure Lysin zeigt (Aspuria and Tamanoi, 2008). Nicht nur die Aminosäurepermease *c3559.03*⁺ liegt in den *tscΔ* - Mutanten fehllokalisiert vor. Auch für die Aminosäurepermease *Cat1* (cationic amino acid transporter) konnte diese Fehllokalisierung beschrieben werden (Aspuria and Tamanoi, 2008). Die Überexpression von *cat1*⁺ resultierte in einer erhöhten Aufnahme basischer Aminosäuren und in einer Canavanin - Sensitivität. Die zusätzliche Deletion des *cat1*⁺ - Genes in der *tsc2Δ* - Mutante supprimierte die durch die *tsc2*⁺ - Deletion vermittelte Canavanin - Resistenz (Aspuria and Tamanoi, 2008). Ebenso konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Deletion des *tsc2*⁺ -

Genes zwar keine Änderung in der Proteinsynthese von Cat1 vermittelte, Cat1 jedoch fehllokalisiert vorlag.

Neben dem beschriebenen Aufnahmedefekt weisen die *tscΔ* - Mutanten in Abhängigkeit von der Zelldichte einen Defekt in der Konjugation auf. Unter nährstoffreichen Bedingungen durchlaufen *S. pombe* - Zellen den mitotischen Zellzyklus. Dahingegen resultiert eine Nährstofflimitation (speziell Stickstoff) in der Arretierung des Zellzyklus in der G₁ - Phase. Dies ermöglicht *S. pombe* - Zellen mit entgegengesetztem Paarungstypen zu paaren und in die Meiose einzutreten. Das Unvermögen der *tscΔ* - Mutanten unter stickstofflimitierenden Bedingungen zu paaren, ist vermutlich auf eine Störung in der Sekretion oder der Erkennung des Paarungspheromons (P- Faktor) zurückzuführen (Matsumoto et al., 2002). Basierend auf diesen Phänotypen wird vermutet, dass, ähnlich wie in Säugern, sowohl *tsc1*⁺ als auch *tsc2*⁺ für die Wahrnehmung und Anpassung an Hungerbedingungen erforderlich sind.

Gleich dem TOR - Signaltransduktionsweg in tierischen Zellen wurde eine negative Regulation der GTPase Rhb1 durch den TSC - Komplex postuliert. So kann der Defekt in der Argininaufnahme der *tsc2Δ* - Mutante durch die Expression einer dominant negativen Form von *rhb1*⁺ (van Slegtenhorst et al., 2004) oder durch den Funktionsverlust von Rhb1 (van Slegtenhorst et al., 2005) unterdrückt werden. Die Expression einer geranylgeranylierten Form der GTPase Rhb1, ausgelöst durch die Inhibierung der Farnesyltransferase Cpp1, resultiert in einer Hypersensitivität gegenüber Canavanin und einer erhöhten Aufnahme von Arginin (Yang et al., 2001; Nakase et al., 2006). Zudem führt eine Inaktivierung von Rhb1 zu einem G₀/G₁ -Arrest, vergleichbar mit der Arretierung des Zellzyklus unter Stickstoffhunger (Mach et al., 2000; Yang et al., 2001). Eine hyperaktive Form von *rhb1*⁺ weist den gleichen Phänotyp wie die *tsc* - Deletionsmutanten auf (Urano et al., 2005). Ähnlich den *tscΔ* - Mutanten resultiert eine Überexpression von Tor2 in einer Canavanin - Resistenz (Weisman et al., 2007). Weiterhin konnte der Defekt in der *tsc2Δ* - Mutante durch die Inhibierung der Aktivität des Tor2 - Proteins supprimiert werden (Matsuo et al., 2007). Diese Daten zeigen, dass der TSC - Komplex, Rhb1 und der SpTORC1 in *S. pombe* existieren und zu tierischen Zellen vergleichbare Funktionen ausüben (Abb. 1.7). Dies konnte auch im Zusammenhang mit dem Tumorsuppressorgen *bhd*⁺ (birt-hogg-dube) beschrieben werden. Gleich dem Säugersystem reguliert das BHD Homologe in *S. pombe* den SpTORC1 positiv (van Slegtenhorst et al., 2007). Über Expressionsanalysen konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Bhd und der TSC - Komplex antagonistische Funktionen in der Regulation der Expression verschiedener Aminosäurepermeasen (*C869.10*⁺, *7G5.06*⁺, *isp5*⁺) und Oligopeptidtransporter (*ptr2*⁺, *isp4*⁺) ausüben und in einem parallelen Signalweg zur Regulation der Funktion des SpTORC1 agieren. In den *tsc*⁺ - Mutanten wurde die Expression dieser Gene reprimiert, hingegen in der *bhdΔ* - Mutante induziert. Sowohl *isp4*⁺, *isp5*⁺, *C869.10*⁺ als auch *7G5.06*⁺, deren Expression durch die *bhd*⁺ - Deletion induziert wurde, werden ebenfalls durch Tor2 negativ reguliert (Matsuo et al., 2007). Ebenso resultierte die Expression eines *rhb1*⁺ - Allels, dessen Phänotyp schwächer als der des Wildtyp - Allels ausgebildet ist, in der *bhdΔ* - Mutante sowie die Zugabe von

Rapamycin in den verschiedenen Mutanten in einer erhöhten Expression der Aminosäuretransporter (van Slegtenhorst *et al.*, 2007).

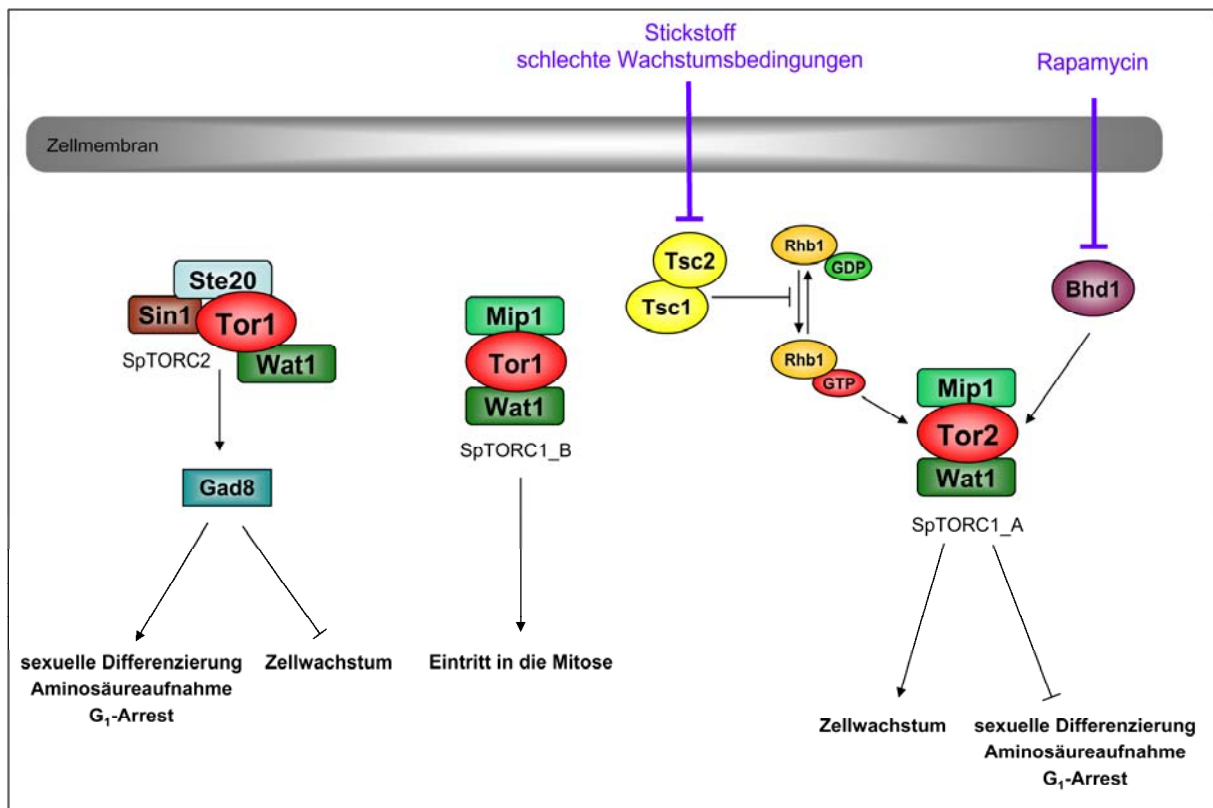


Abbildung 1.7: Der TOR - Signalweg in *S. pombe*. Über den TSC - Komplex wird die Aktivität der kleinen GTPase Rhb1 und, in Folge dessen, die von Tor2 negativ reguliert. Über die Regulation des TSC - Komplexes liegen noch keine Untersuchungen vor. Der SpTORC1_A reguliert das Zellwachstum positiv. Des Weiteren übt der SpTORC1_A einen negativen Einfluss auf den G₁ - Arrest, der sexuellen Differenzierung und der Aminosäureaufnahme auf. Ebenso ist Bhd1 negativ in die Regulation verschiedener Aminosäurepermeasen über den SpTORC1_A involviert. Der SpTORC1_B reguliert unter schlechten Wachstumsbedingungen den Eintritt in die Mitose positiv. Im Gegensatz dazu reguliert der SpTORC2 durch Phosphorylierung von Gad8 den G₁ - Arrest, sexuelle Entwicklung und Aminosäureaufnahme positiv. Der SpTORC2 scheint auch in der Regulation des Zellwachstums unter Stressbedingungen involviert zu sein. Modifiziert nach Otsubo and Yamamoto (2008).

1.3. Ziel dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass in *S. pombe* ein TSC - Komplex existiert (1.2). Jedoch lagen keine Untersuchungen zu seiner Regulation vor. Im Gegensatz zu Säugern muss *S. pombe* keine Wachstumsfaktor - induzierten Signale verarbeiten, hingegen aber die Adaption des Zellwachstums an das Nährstoffangebot. Somit lag die Vermutung nahe, dass der nährstoffinduzierte Mechanismus über den TSC - Komplex konserviert ist.

Im Zuge dieser Arbeit sollten neue Regulatoren / Regulationsmöglichkeiten des TSC - Komplexes in *S. pombe* identifiziert werden, um den Nährstoff - „Input“ des TOR - Signalweges genauer aufzuschlüsseln. In *S. pombe* existieren homologe Untereinheiten der AMPK. Jedoch lagen zu Beginn dieser Arbeit noch keine Untersuchungen dieser Homologe vor. Aus diesem Grund, sollte ebenfalls untersucht werden, ob die Regulation des TSC - Komplexes über die potentielle AMPK in *S. pombe* konserviert ist. Dabei sollten folgende Aspekte bearbeitet werden:

- I) Identifizierung neuer Regulationsmöglichkeiten der funktionellen Aktivität des TSC - Komplexes in *S. pombe*.
- II) Konservierung des AMPK - Komplexes in *S. pombe*.
- III) Funktionelle und biochemische Charakterisierung der potentiellen Homologe der für die AMPK - kodierenden Untereinheiten.
- IV) Identifizierung neuer Signale, welche zu einer Phosphorylierung / Aktivierung der potentiellen AMPK führen.
- V) Einordnung der potentiellen AMPK in den TOR - Signaltransduktionsweg.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, in der Reinheit „pro analysis“ von den Firmen Merck (Darmstadt), Riedel de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

2.1.1. Stämme und Medien

2.1.1.1. Hefestämme

2.1.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* - Stämme

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
AN4-3D	TB50 <i>Mata</i> Δ <i>snf1::His3MX6</i>	A. Lorberg, 2005
TB50a	<i>Mata leu2-3, 112 ura3-52 rme1 trp1 Δhis3 GAL⁺ HMLa</i>	Loewith <i>et al.</i> , 2002

2.1.1.1.2. *Schizosaccharomyces pombe* - Stämme

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete *S. pombe* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
S2010	<i>BA121 h⁺ tor2-51::ura4⁺ ura4-d18</i>	Aspuria <i>et al.</i> , 2007
Sp34	972 <i>h⁻</i>	Leupold, 1970
SPAD1-4	972 <i>h⁻ Δtsc1::KanMX6</i>	A. Dierkes
SPAD7-2D	972 <i>h⁻ Δtsc1::KanMX6 leu1-32</i>	A. Dierkes
SPAD29-1B	972 <i>h⁺ Δtsc2::KanMX6</i>	A. Dierkes
SPAD29-2A	972 <i>h⁻ Δtsc2::KanMX6 leu1-32</i>	A. Dierkes
SPAD30-2A	972 <i>h⁺ Δtsc1::HghMX6</i>	A. Dierkes
SPAD36-1B	972 <i>h⁻ Δtsc1::KanMX6 Δtsc2::natMX6</i>	A. Dierkes
SPAD87-39C	972 <i>h⁻ leu1-32</i>	A. Dierkes
SPKB1-2	972 <i>h⁻ SPCC1919.03c⁺-13myc-KanMX6</i>	K. Baumgart
SPKB2-10	972 <i>h⁻ SPCC1919.03c⁺-TAP-KanMX6</i>	K. Baumgart
SPKB3-1	972 <i>h⁻ ΔSPCC1919.03c⁺::NatMX6</i>	K. Baumgart
SPKB5-2	972 <i>h⁻ Δchs2::NatMX6</i>	K. Baumgart
SPKS1	972 <i>h⁻ tsc1⁺-TAP-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS6-1	972 <i>h⁻ tsc2⁺-TAP-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS8-1C	972 <i>h⁺ tsc1⁺-TAP-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS9-1A	972 <i>h⁻ tsc2⁺-TAP-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS10-1A	972 <i>h⁻ tsc2⁺-13myc-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS12-2	972 <i>h⁺ ssp2⁺-TAP-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS15-1C	972 <i>h⁺ ssp2⁺-3HA-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS15-2A	972 <i>h⁻ ssp2⁺-3HA-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS19-1A	972 <i>h⁺ ssp2⁺-13myc-KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS19-2C	972 <i>h⁻ ssp2⁺-13myc-KanMX</i>	diese Arbeit
SPKS23-3A	972 <i>h⁺ Δssp2::KanMX6 Δtsc1::KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS23-3B	972 <i>h⁺ ssp2::KanMX6</i>	diese Arbeit
SPKS25-5C	972 <i>h⁺ Δssp2::KanMX6 leu1-32</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
SPKS23-5D	972 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::KanMX6 Δ tsc1::KanMX6 <i>ura4-D18</i>	diese Arbeit
SPKS26-6A	972 <i>h</i> ⁺ Δ tsc2::NatMX6	diese Arbeit
SPKS29-8C	972 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::KanMX6 Δ tsc1::HghMX6 Δ tsc2::NatMX6 <i>ura4-D18</i>	diese Arbeit
SPKS33-3C	972 <i>h</i> ⁻ Δ ssp2::NatMX6 <i>ura4-D18</i>	diese Arbeit
SPKS33-2C	972 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::NatMX6 <i>ura4-D18</i>	diese Arbeit
SPKS33-4B	972 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::NatMX6	diese Arbeit
SPKS35-5A	972 <i>h</i> ⁻ Δ ssp2::NatMX6 Δ tsc2::NatMX6 <i>ura4-D18</i>	diese Arbeit
SPKS38-2B	972 <i>h</i> ⁻ Δ ssp2::KanMX6 Δ tsc2::ura4 ⁺ <i>leu1-32</i>	diese Arbeit
SPKS39-5D	972 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::KanMX6 Δ tsc2::ura4 ⁺	diese Arbeit
SPKS46-4	972 <i>h</i> ⁺ <i>ssp2</i> ^{T172A} -13myc-KanMX6	diese Arbeit
SPKS48-1	972 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::KanMX6 Δ tsc1::HphMX6 Δ tsc2::NatMX6	diese Arbeit
SPKS59-9	BA121 <i>h</i> ⁺ <i>tor2-51</i> ::ura4-D18 Δ ssp2::NatMX6 <i>ura4-D18</i>	diese Arbeit
SPKS64-15	BA121 <i>h</i> ⁺	diese Arbeit
SPKS65-9	BA121 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::NatMX6	diese Arbeit
SPKS67-2	972 <i>h</i> ⁻ <i>cbs2</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPKS70-8	972 <i>h</i> ⁻ Δ tsc1::HghMX6 Δ ssp2::KanMX6 <i>leu2-31</i>	diese Arbeit
SPKS77-1D	972 <i>h</i> ⁺ SPCC1919.03c ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPKS78-3A	972 <i>h</i> ⁺ <i>ppk9</i> ⁺ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPKS78-4C	972 <i>h</i> ⁻ <i>ppk9</i> ⁺ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPKS81-1D	972 <i>h</i> ⁺ SPCC1919.03c ⁺ -13myc-KanMX6	diese Arbeit
SPKS82-2A	972 <i>h</i> ⁻ <i>cbs2</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPKS83-1D	972 <i>h</i> ⁺ <i>ppk9</i> ⁺ -3HA-KanMX6 SPCC1919.03c ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPKS83-2C	972 <i>h</i> ⁻ <i>ppk9</i> ⁺ -3HA-KanMX6 SPCC1919.03c ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPKS85-6A	972 <i>h</i> ⁻ <i>cbs2</i> ⁺ -TAP-KanMX6 SPCC1919.03c ⁺ -13myc-KanMX6	diese Arbeit
SPKS86-2C	972 <i>h</i> ⁻ <i>ssp2</i> ⁺ -13myc-KanMX6 SPCC1919.03c ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPKS87-3A	972 <i>h</i> ⁻ <i>ssp2</i> ⁺ -13myc-KanMX6 <i>cbs2</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPKS90-3A	972 <i>h</i> ⁺ <i>cbs2</i> ⁺ -TAP-KanMX6 <i>ppk9</i> ⁺ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPKS96-4B	972 <i>h</i> ⁺ <i>cbs2</i> ⁺ -TAP-KanMX6 <i>ppk9</i> ⁺ -3HA-KanMX6 Δ ssp2::NatMX6	diese Arbeit
SPKS97-1B	972 <i>h</i> ⁺ SPCC1919.03c ⁺ -TAP-KanMX6 <i>ppk9</i> ⁺ -3HA-KanMX6 Δ ssp2::NatMX6	diese Arbeit
SPKS98-2C	972 <i>h</i> ⁻ Δ ppk9::NatMX6	diese Arbeit
SPKS99-3A	972 <i>h</i> ⁻ <i>ssp2</i> ⁺ -13myc-KanMX6 SPCC1919.03c ⁺ -TAP-KanMX6 Δ ppk9::NatMX6	diese Arbeit
SPKS100-1A	972 <i>h</i> ⁺ Δ tsc1::KanMX6 Δ ppk9::NatMX6	diese Arbeit
SPKS100-1D	972 <i>h</i> ⁺ Δ tsc1::KanMX6 Δ tsc2::KanMX6 Δ ppk9::NatMX6	diese Arbeit
SPKS100-3B	972 <i>h</i> ⁻ Δ tsc2::KanMX6 Δ ppk9::NatMX6	diese Arbeit
SPKS101-6A	972 <i>h</i> ⁻ Δ ssp2::NatMX6 Δ ppk9::NatMX6	diese Arbeit
SPKS102-7	972 <i>h</i> ⁺ Δ ssp2::KanMX6 <i>leu1-32</i>	diese Arbeit

2.1.1.1.3. Medien zur Anzucht der HefestämmeMedien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*

Vollmedium (YPD):	1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Glucose 10 % 10 x Aminosäure- / Basenmix
Minimalmedium (YNBD):	0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB) 2 % Glucose 10 % 10x Aminosäure- / Basenmix
10 x Aminosäure-/Basenmix:	200 mg/l Arginin, Methionin, Adenin, Histidin, Uracil 300 mg/l Isoleucin, Lysin, Tyrosin 500 mg/l Phenylalanin 2 g/l Threonin 1 g/l Leucin 400 mg/l Tryptophan

Medien für die Kultivierung von *S. pombe*

Vollmedium (YE5S):	0,5 % Hefeextrakt, 3 % Glucose 10 % 10x Aminosäure-/Basenmix
Minimalmedium (EMM):	3 g/l Kalium Phtalat 2,75 g/l Dinatriumhydrogenphosphat 5 g/l Ammoniumchlorid oder 1 g/l Glutaminsäure 2 % 50 x Salzstocklösung 0,1 % 1000 x Vitaminstocklösung 0,01 % 10.000 x Mineralstocklösung 10 % 10 x Aminosäure-/Basenmix (je nach Bedarf) 2 % Glukose (je nach Bedarf durch 2 % Raffinose, 2 % Galaktose, 3 %, Ethanol oder 3 % Glycerin ersetzt)
50 x Salzstocklösung:	53,5 g/l Magnesiumchlorid 0,74 g/l Calciumchlorid 50 g/l Kaliumchlorid 2 g/l Natriumsulfat
1000 x Vitaminstocklösung:	1 g/l Natriumpantothenensäure 10 g/l Nikotinsäure

	10 g/l Inositol
	10 mg/l Biotin
10000 x Mineralstocklösung:	5 g/l Borsäure
	4 g/l Mangansulfat
	4 g/l Zinksulfat
	2 g/l Eisen(III)chlorid
	4 g/l Molybdänsäurehydrat
	1 g/l Kaliumiodid
	4 g/l Kupfersulfat Pentahydrat
	10 g/l Zitronensäure
Sporulationsmedium:	3 % Malzextrakt
	10 % Aminosäure-/Basenmix
	2 % Agar
	pH 5,5 mit NaOH einstellen
10 x Aminosäure-/Basenmix:	750 mg/l L-Histidin, L-Leucin, L-Uracil, L-Lysin
	1,5 g/l Adenin Hemisulfat

Zur Herstellung der Platten wurde dem Medium 2 % Agar zugegeben. Zu Selektionszwecken auf G418- oder NatMX - Resistenz wurde dem Agar entweder 100 mg/l G418-Sulfat (Calbiochem) oder Clonat (Werner BioAgents) aus einer sterilen Stammlösung (5 mg/ml) nach dem Autoklavieren zugegeben. Zu Selektionszwecken auf HphMX - Resistenz wurde dem Agar 300 mg/l Hygromycin B (Calbiochem) aus einer sterilen Stammlösung (5 mg/ml) nach dem Autoklavieren zugegeben. Die Anzucht erfolgte je nach Stamm bei 25 °C, 30 °C oder 35 °C.

Osmotisch stabilisierendes Medium wurde durch die Zugabe von 1 M Sorbitol erhalten.

Zur phänotypischen Charakterisierung der Hefestämme war der Zusatz von 2-Deoxyglucose und diverse Aminosäure-Analoga (5-Fluoro-D,L-Tryptophan; D-L-Ethionin; Thialysin; p-Fluoro-D,L-Phenylalanin) im Medium erforderlich. Das Medium wurde wie gewöhnlich hergestellt und durch Zugabe sterilfiltrierter Stammlösungen nach dem Autoklavieren auf die gewünschte Endkonzentration der zu testenden Substanzen eingestellt.

2.1.1.1.4. Lagerung der Hefestämme

Die Lagerung der Hefestämme erfolgte bei 4 °C auf YE5S - Nährboden. Alle 2 - 3 Monate wurden diese frisch ausgestrichen. Zusätzlich wurde von allen Stämmen Gefrierkulturen angelegt. Dafür wurden die Zellen in 5 ml Vollmedium über Nacht bis zur stationären Phase angezogen. Nach dem Absitzen der Zellen wurde der Überstand bis auf 1 ml vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden 700 µl der resuspendierten Zellen mit 700 µl „Yellow freezing Mix“ (5 g/l Hefextrakt; 3 % Glucose; 250 mg/l Histidin, Leucin, Adenin, Lysin, Uracil, Glutaminsäure; 30 % Glycerol) gemischt und bei -80 °C gelagert.

2.1.1.2. *E. coli* - Stämme

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* - Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
JM110	<i>rpsL (Strr) thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lacproAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>	Stratagene, Heidelberg
DH5α	<i>F⁺ φ 80dlacZ M15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.1.3. Medien zur Anzucht der Bakterienstämme

LB-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl

Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium 2 % Agar zugegeben. Die Anzucht der Bakterienstämme erfolgte bei 37 °C.

Zur Selektion plasmidhaltiger *E. coli* - Stämme wurde dem Medium je nach plasmidkodierter Antibiotikaresistenz 80 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin aus einer 100 mg/ml bzw. 25 mg/ml Stammlösung nach dem Autoklavieren zugegeben.

Für die so genannte Blau - / Weiß - Selektion wurde zusätzlich 100 µl einer IPTG / X-Gal - Stammlösung (2,4 mg/ml IPTG, 10 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid) auf den Platten ausgestrichen.

2.1.1.4. Lagerung der Bakterienstämme

Die Lagerung plasmidhaltiger Bakterienstämme erfolgte längstensfalls eine Woche auf Platte bei 4 °C. Zusätzlich wurden von allen plasmidhaltigen Stämmen Glycerinkulturen (1 ml Kultur, 500 µl 50 % Glycerin) angelegt. Diese wurden bei -80 °C gelagert.

2.1.2. Ausgangsplasmide

2.1.2.1. Bakterienplasmide

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Bakterienplasmide in alphabetischer Reihenfolge.

Name	Selektionsmarker / Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pALO49	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6^R</i>	Plasmid, das für einen TAP-Tag kodiert, terminiert vom <i>ADHI</i> - Terminator und als Selektionsmarker das <i>KanMX6</i> - Resistenz - Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> - TEF - Promotors und den TEF - Terminator enthält	A. Lorberg
pCR2.1-hph	<i>Amp^R</i> <i>HphMX</i>	Plasmid, das das Hygromycin - Resistenz - Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> - TEF - Promotors und TEF - Terminators enthält	Sato <i>et al.</i> , 2005
pCR2.1-nat	<i>Amp^R</i> <i>NatMX6</i>	Plasmid, das das Noursethricin - Resistenz - Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> - TEF - Promotors und TEF - Terminators enthält	Sato <i>et al.</i> , 2005
pFA6a-13Myc-kanMX6	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6^R</i>	Plasmid, das für einen 13fachen myc-Tag kodiert, terminiert vom <i>ADHI</i> - Terminator und als Selektionsmarker das <i>KanMX6</i> - Resistenz - Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> - TEF - Promotors und den TEF - Terminator enthält	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-3HA-kanMX6	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6^R</i>	Plasmid, das für einen 3HA-Tag kodiert, terminiert vom <i>ADHI</i> - Terminator und als Selektionsmarker das <i>KanMX6</i> - Resistenz - Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> - TEF - Promotors und den TEF - Terminator enthält	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-kanMX6	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6^R</i>	Plasmid, das als Selektionsmarker das <i>KanMX6</i> - Resistenz - Gen enthält	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pUC19	<i>Amp^R</i>	<i>E. coli</i> - Klonierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC21	<i>Amp^R</i>	<i>E. coli</i> - Klonierungsvektor	Vieira & Messing, 1991
pUK21	<i>Kan^R</i>	<i>E. coli</i> - Klonierungsvektor	Vieira & Messing, 1991

2.1.2.2. Hefepasmide

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Hefepasmide.

Name	Selektionsmarker / Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pAD5	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	YCplac33 - Derivat, das für das <i>tsc2⁺</i> -Gen kodiert	dieses Labor
pAD9	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	pUR18 - Derivat, das für das <i>tsc1⁺</i> -Gen kodiert	dieses Labor
pAD10	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	pUR18 - Derivat, der für das <i>tsc2⁺</i> -Gen kodiert	dieses Labor
pAD19	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺/leu1⁺</i> <i>ARS1</i>	<i>E. coli</i> / <i>S. pombe</i> - "Shuttle"-Vektor	dieses Labor
pAD20	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺/leu1⁺</i> <i>ARS1</i>	pAD19 - Derivat, das für das <i>rhb1⁺</i> -Gen kodiert	dieses Labor
pAD28	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺/leu1⁺</i> <i>ARS1</i>	pAD19 - Derivat, das für das <i>ssp2⁺</i> -Gen kodiert	dieses Labor
pAN12	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	YCplac33 - Derivat, das für das <i>SNF1</i> -Gen kodiert	dieses Labor
pUR18	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	<i>E. coli/S. pombe</i> - "Shuttle"-Vektor	Barbet <i>et al.</i> , 1992
pUR19	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	<i>E. coli/S. pombe</i> - "Shuttle"-Vektor	Barbet <i>et al.</i> , 1992
YCplac111	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> - "Shuttle"-Vektor	Gietz & Sugino, 1988
YCplac33	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> - "Shuttle"-Vektor	Mueller & Hinnebusch, 1986
YEplac181	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>2μ</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> - "Shuttle" - Vektor	Gietz & Sugino, 1988
YEplac195	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>2μ</i>	<i>E. coli/S. cerevisiae</i> - "Shuttle" - Vektor	Gietz & Sugino, 1988

2.1.3. Eigene Plasmidkonstruktionen

2.1.3.1. Bakterienplasmide

Tabelle 2.6: In dieser Arbeit konstruierte Bakterienplasmide.

Name	Selektionsmarker / Replikationsmodul	Konstruktion
pKS20	<i>Amp^R</i>	Ein 930bp großes <i>HindIII</i> -Fragment aus dem Plasmid pKS13 wurde in den <i>HindIII</i> -geschnittenen Vektor pUC21 kloniert.
pKS37	<i>Amp^R</i>	Ein mit den Oligonukleotiden TSC2-3436c und 5' Oligo vor <i>SacI</i> synthetisiertes PCR-Fragment, geschnitten mit <i>SacI/Asp718I</i> , wurde in den <i>SacI/Asp718I</i> -geschnittenen Vektor pUC21 kloniert.
pKS38	<i>Amp^R</i>	Ein mit den Oligonukleotiden 5' Oligo vor <i>Asp718I</i> und 3' Oligo nach <i>BamHI</i> synthetisiertes PCR-Fragment, geschnitten mit <i>Asp718I/BamHI</i> , wurde in den <i>Asp718I/BgIII</i> -geschnittenen Vektor pUC21 kloniert.
pKS45	<i>Amp^R</i>	In den <i>SpeI</i> geschnittenen Vektor pUC21 wurde mit einem von dem Plasmid pKS37 mit den Oligonukleotiden Reverse, 5' tsc2-S1260A, U-47 und 3' tsc2-S1260A mutagenisiertes <i>SpeI</i> -geschnittenes PCR-Fragment kloniert.
pKS46	<i>Amp^R</i>	In den <i>SpeI</i> geschnittenen Vektor pUC21 wurde mit einem von dem Plasmid pKS37 mit den Oligonukleotiden Reverse, 5' tsc2-S1260D, U-47 und 3' tsc2-S1260D mutagenisiertes <i>SpeI</i> -geschnittenes PCR-Fragment kloniert.
pKS53	<i>Amp^R</i>	In den <i>SpeI</i> geschnittenen Vektor pUC21 wurde mit einem von dem Plasmid pKS38 mit den Oligonukleotiden Reverse, 5' tsc2-T1260D, U-47 und 3' tsc2-T1260D mutagenisiertes <i>SpeI</i> -geschnittenes PCR-Fragment kloniert.
pKS54	<i>Amp^R</i>	In den <i>SpeI</i> geschnittenen Vektor pUC21 wurde mit einem von dem Plasmid pKS38 mit den Oligonukleotiden Reverse, 5' tsc2-T1260A, U-47 und 3' tsc2-T1260A mutagenisiertes <i>SpeI</i> -geschnittenes PCR-Fragment kloniert.

2.1.3.2. Hefepasmide

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit konstruierte Hefepasmide in numerischer Reihenfolge.

Name	Selektionsmarker / Replikationsmodul	Konstruktion
pKS5	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>KanMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Der mit <i>PacI</i> geschnittene Vektor pAD5 wurde mit einem von dem Plasmid pFA6a-13myc-KanMX6 mit den Oligonukleotiden SpTSC2-F2 und SpTsc2-R1 synthetisiertes PCR-Fragment kotransformiert, so dass dieses Plasmid nach einer <i>in vivo</i> Rekombination für ein <i>tsc2⁺</i> -13myc-Fusionsprotein kodiert.
pKS11 hin	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	In den mit <i>BamHI</i> geschnittenen Vektor YCplac33 wurde ein mit den Oligonukleotiden SSP2-5 <i>BamHI</i> und SSP2-3 <i>BamHI</i> erzeugtes, mit <i>BamHI</i> geschnittenes PCR-Fragment kloniert. Dabei ist das <i>ssp2⁺</i> -Gen in der gleichen Orientierung angeordnet wie das Ampicillin-Resistenz-Gen.
pKS12	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>KanMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Der mit <i>BseRI</i> geschnittene Vektor pKS11 wurde mit einem von dem Plasmid pFA6a-KanMX6 mit den Oligonukleotiden SpSSP2-F1 und SpSSP2-R1 erzeugten PCR-Fragment kotransformiert. Das Plasmid kodiert damit für eine <i>Δssp2::KanMX6</i> -Deletionskassette.

Name	Selektionsmarker / Replikationsmodul	Konstruktion
pKS22	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>CEN/ARS</i>	Der mit <i>BseRI</i> geschnittene Vektor pKS11 wurde mit einem von dem Plasmid pKS20 mit den Oligonukleotiden Reverse, 5'ssp2 alanin, U-47 und 3'ssp2 alanin mutagenisierten PCR-Fragment kotransformiert, so dass dieses Plasmid nach einer <i>in vivo</i> Rekombination für ein Ssp2-Protein kodiert, in welchem die Aminosäure T189 zu Alanin mutiert wurde.
pKS23	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>CEN/ARS</i>	Der mit <i>BseRI</i> geschnittene Vektor pKS11 wurde mit einem von dem Plasmid pKS20 mit den Oligonukleotiden Reverse, 5'ssp2 aspartat, U-47 und 3'ssp2 aspartat mutagenisiertes PCR-Fragment kotransformiert, so dass dieses Plasmid nach einer <i>in vivo</i> Rekombination für ein Ssp2-Protein kodiert, in welchem die Aminosäure T189 zu Aspartat mutiert wurde.
pKS24	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>NatMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Der mit <i>BseRI</i> geschnittene Vektor pKS11 wurde mit einem von dem Plasmid pCR2.1-nat mit den Oligonukleotiden SpSSP2-F1 und SpSSP2-R1 erzeugten PCR-Fragment kotransformiert. Das Plasmid kodiert damit für eine Δ ssp2:: <i>NatMX6</i> -Deletionskassette.
pKS30	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>KanMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Der mit <i>AflIII</i> geschnittene Vektor pKS23 wurde mit einem von dem Plasmid pFA6a-13myc-KanMX6 mit den Oligonukleotiden SpTSC2-F2 und SpTsc2-R1 synthetisierten PCR-Fragment kotransformiert, so dass dieses Plasmid nach einer <i>in vivo</i> Rekombination für ein Ssp2 ^{T189D} -13myc-Fusionsprotein kodiert.
pKS33 hin	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	In den mit <i>BamHI</i> geschnittenen Vektor pUR18 wurde das mit <i>BamHI</i> -geschnittene 3375bp große Fragment aus dem Plasmid pKS11 kloniert. Dabei ist das <i>ssp2⁺</i> -Gen entgegen der Orientierung des Ampicillin-Resistenz-Gens angeordnet.
pKS36	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>KanMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Der mit <i>KpnI</i> geschnittene Vektor pKS22 wurde mit einem von dem Plasmid pFA6a-13myc-KanMX6 mit den Oligonukleotiden SpTSC2-F2 und SpTsc2-R1 synthetisierten PCR-Fragment kotransformiert, so dass dieses Plasmid nach einer <i>in vivo</i> Rekombination für ein Ssp2 ^{T189A} -13myc-Fusionsprotein kodiert.
pKS55	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	In den mit <i>EcoRI</i> geschnittenen Vektor pUR18 wurde das mit <i>EcoRI</i> -geschnittene 3303bp große Fragment aus dem Plasmid pAN12her kloniert. Dabei ist das <i>SNF1</i> -Gen entgegen der Orientierung des Ampicillin-Resistenz-Gens angeordnet.

2.1.4. Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma - Genosys synthetisiert.

Tabelle 2.8: In dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Verwendete Restriktions-erkennungssequenzen sind unterstrichen und fett gedruckt.

Name	Sequenz
3' ssp2 alanin	5'- CAT AAT TTG GAC TGC CAC AGG AAG CTT TTA GGA AAT TAC CG - 3'
3' ssp2 aspartat	5'- CAT AAT TTG GAC TGC CAC AGG AGT CTT TTA GGA AAT TAC CG - 3'
3' Oligo nach BamHI	5'- CAC CGT TCA AGT CTT CCT CG - 3'
3' ssp2 -KanMX	5'- CAA TTC ATA AAT GTT TCA ACA GAA AAT GGC GGT AAT TAA TGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC - 3'

Name	Sequenz
3' tsc2-S1260A	5'- CAA TTG CCG GTA ATG CAT CGC TAG CAA CAA TTT TGT AAC G - 3'
3' tsc2-S1260D	5'- CAA TTG CCG GTA ATG CAT CGC TGT CAA CAA TTT TGT AAC G - 3'
3' tsc2-T1046A	5'- AGA AAT GAG AGA CAA AGC TGC TAG GCG CAC ACA AAA GCC CCC TC - 3'
3' tsc2-T1046D	5'- AGA AAT GAG AGA CAA AGC TGC TAG GAT CAC ACA AAA GCC CCC TC - 3'
5' ssp2 alanin	5'- GAC AGA CGG TAA TTT CCT AAA AGC TTC CTG TGG CAG TCC - 3'
5' ssp2 aspartat	5'- GAC AGA CGG TAA TTT CCT AAA AGA CTC CTG TGG CAG TCC - 3'
5' Oligo vor Asp718I	5'- CAG CCT CTT CTG CTT CCC TC - 3'
5' Oligo vor SacI	5'- CGG GAC TTA AGG ATT GTA TCG - 3'
5' ssp2-KanMX	5'- CTT TTA GCG AAT AAG GTT GCA TGA AGA TAC TAG TGT CCG GCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA - 3'
5' tsc2-S1260A	5'- CCG TCG TTA CAA AAT TGT TGC TAG CGA TGC ATT AC - 3'
5' tsc2-S1260D	5'- CCG TCG TTA CAA AAT TGT TGA CAG CGA TGC ATT AC - 3'
5' tsc2-T1046A	5'- CTC TTA CGA GGG GGC TTT TGT GTG CGC CTA GCA GCT TTG - 3'
5' tsc2-T1046D	5'- CTC TTA CGA GGG GGC TTT TGT GTG ATC CTA GCA GCT TTG - 3'
KanMX3'out	5'- CTT GAT GGT CGG AAG AGG C - 3'
KanMX5'out	5'- GGC TGG CCT GTT GAA CAA G - 3'
Nat-3'out	5'- CCC CGG TGG CGG TGA CGC GG - 3'
Nat5-'out	5'- CCG GCG ATC CAC GCG TAC CGG - 3'
Ppk9 3'in vivo rekombi	5'- GAG CTC GGT ACC CGG GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG CTT GTT ATA TGG CAA ATC CTC - 3'
Ppk9 5'in vivo Rekombi	5'- GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TTG CAT GCC TGC AGG GCA TTG ATG GCA TCG TGC GA - 3'
Ppk9-3 überpr	5'- CCG TCG TGC AAG AGA CTT C - 3'
Ppk9-3BamHI	5'- GCG GGG ATC CCT TGT TAT ATG GCA AAT CCT C - 3'
PPK9-5BamHI	5'- GCG GGG ATC CCG GCT GTA TTG TTG TAG C - 3'
PPK9-5BamHIneu	5'- GCG GGG ATC CGC ATT GAT GGC ATC GTG CGA - 3'
Ppk9-5überprü	5'- CGG GCG AAT GAC TCC AAG G - 3'
PPK9-F1	5'- AAC GAA TTT CAT CCT ATA AAG TCA GCT GGC TCG ACT TGC TCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA - 3'
ppk9-F2	5'- ATG ATT CTA TAA AGT ACA CTT CAT CTT ACA GTC CAA TGC CAT TTT TAG AAG TTG TCA AAC AAT TGA TCC TTA AAA TTG CAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
PPK9-R1	5'- TAT CAA AAT TCA ACT TAG TTT CAC AAT ATT AGT AAA TGC AAA CAA TAT TGA AAA CAA AAG CTT TAC AAC AAA AAA AAT CGG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
Reverse	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG - 3'
SpSSP2-F1	5'- GGA AAA AAA GAT TTT ATC AAT AAA CTT TCA ATA TTG GAT TCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA - 3'
SpSSP2-F2	5'- ATC ATG GCA TGG ATG ATC TTA AGT CAT CTT TCC CAT TTT TAG ATT TGT GTG GCT ATG CTG TGT TGC AAG TTA TTT TCT GCA CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA - 3'
SpSSP2intern	5'- CCT CAT TGT AAA AGG GAA GG - 3'

Name	Sequenz
SpSSP2-R1	5'- TGC AAC CTT ATT CGC TAA AAG AAA AGG TAA AAA AAA TAA AAT GTG TCT TTG CTA TTG AGT AGA TTT GTT CAA CAA TGG GTG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
SpSSP2-R2	5'- TGC AAC CTT ATT CGC TAA AAG AAA AGG TAA AAA AAA TAA AAT GTG TCT TTG CTA TTG AGT AGA TTT GTT CAA CAA TGG GTG AAT TCG AGC TCG TT CT AA - 3'
SpTsc1 -3PstI	5'- CCG CCT GCA GGG GCC AGG CAA GAC GAC CG - 3'
SpTsc1 intern	5'- GTA CCG TGA GTT GGA GGG C - 3'
SpTsc1-F2	5'- GTA ATG ACT CTT TGC ATC CTA AAG TTG GCC CGC CAC GTA GAC AGT CTA CTG ATA CAA GTC GTT CTA CGT TTC GCC AAT ACC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
SpTsc1-R1	5'- ATA AGG AGA TTC ATA CAC AGA ATT ATG ATG GTC GTG AAA AAT CGT AAT CTA ATT ATT TTA TAT GGA ATG AGC AAG TAT GTG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
SpTsc2-5neu	5'- CGA TGT TTC ATT TAT AGC - 3'
SpTsc2-5neu	5'- CGA TGT TTC ATT TAT AGC - 3'
SSP2-3BamHI	5'- GCG GGG ATC CCA ACT AAT TAC AAA CAA GCT AGC - 3'
SSP2-5BamHI	5'- GCG GGG ATC CGA TCA CTG TTT AAA TGT TGC TG - 3'
SSP2-5mehr	5'- CTT GTT TAC GAG GAT GTC C - 3'
TSC1-B1	5'- ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT CCA ACC ACC ATG CCG CTG CAA TCG CTA GTC AAA GC - 3'
TSC1-B2	5'- TCC GCC ACC ACC AAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA GTA TTG GCG AAA CGT AGA ACG AC - 3'
Tsc2-3intern EcorI	5'- GCG GGA ATT CGA AGC AAG CTT CAG TCC ACG C - 3'
Tsc2-3intern EcorIneu	5'- GCG GGA ATT CCG CAA TAT CCA AGG TAC GAA - 3'
TSC2-3mehr3'	5'- CGA TTA TTG CGA AGT TGT GC - 3'
TSC2-3Sall	5'- GGC GGT CGA CCC CTT TCT ACA TTC ATC TCA - 3'
Tsc2-5intern BamHI	5'- GCG GGG ATC CGC TTC TAT AAC TTT AAG TTC - 3'
Tsc2-5intern BamHI neu	5'- GCG GGG ATC CCT CAT GCT GCA AGA AGT GAA - 3'
TSC2-B1	5'- ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT CCA ACC ACC ATG AAC AAT AAA TCA CTT TTG GAT C - 3'
TSC2-B2	5'- TCC GCC ACC ACC AAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA TAA ATA ACT AGT AAA GTC CG - 3'
U-47	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3'
ura4-3out	5'- CCT GTT GTC GAA GCC AAG AG - 3'
ura4-5out	5'- CAA ATC GAC CGC GAC TGA CA - 3'
SpSSP2-3PstI	5'- CCC GCT GCA GGT TCC TCG ATG TCG CAG CTG C - 3'
SSP2-3BamHI	5'- GCG GGG ATC CCA ACT AAT TAC AAA CAA GCT AGC - 3'
Ppk9-3BamHI	5'- GCG GGG ATC CCT TGT TAT ATG GCA AAT CCT C - 3'
SpSSP2-5PstI	5'- CCC GCT GCA GCA ACG CTG CAC TTA ACA ACC A - 3'
SSP2-5BamHI	5'- GCG GGG ATC CGA TCA CTG TTT AAA TGT TGC TG - 3'
PPK9-5BamHI	5'- GCG GGG ATC CCG GCT GTA TTG TTG TAG C - 3'
PPK9-5BamHIneu	5'- GCG GGG ATC CGC ATT GAT GGC ATC GTG CGA - 3'
isp4-3north	5'- GGA AAT TCT CCA GCC ATT GG - 3'
ISP5-3'	5'- CAA AGA ATT CTA CCT CAC C - 3'
STE11-3'	5'- GGT GAT CTA TAA TAG ATG CC - 3'
isp4-5north	5'- CCA TCA ATG AGT CTC CCA TC - 3'

Name	Sequenz
ISP5-5'	5' - CAC TGG GTC AAT CGA CGA G - 3'
STE11-5'	5' - GCT TTA TCG TCG AGA TCG C - 3'

2.1.5. Verwendete Antikörper

Tabelle 2.11: In dieser Arbeit verwendete Antikörper - Kombinationen. Die verwendeten Verdünnungen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
monoklonaler anti-myc-Antikörper (9E10) aus Maus (Roche)	an die alkalische Phosphatase gekoppeltes Alexa Fluor 680 anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege (Molecular probes, Inc)
monoklonaler anti-HA-Antikörper aus Maus (dieses Labor)	an die alkalische Phosphatase gekoppeltes Alexa Fluor 680 anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege (Molecular probes, Inc)
polyklonaler anti-protA-Antikörper aus Kaninchen (Sigma)	an die alkalische Phosphatase gekoppeltes Alexa Fluor 800 anti-Kaninchen IgG (polyklonal) aus Ziege (LI-COR Biosciences)
monoklonaler anti-Phospho-AMPk α (T172) (40H9) aus Kaninchen (NEB)	an die alkalische Phosphatase gekoppeltes Alexa Fluor 800 anti-Kaninchen IgG (polyklonal) aus Ziege (LI-COR Biosciences)
	Peroxidase-konjugierter anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus Esel (Amersham Biosciences)
monoklonaler anti-Phospho-Threonin-Antikörper Q7 aus Maus (Qiagen)	Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG-Antikörper aus Schaf (Amersham Biosciences)
monoklonaler anti-Phospho-Serin-Antikörper Q7 aus Maus (Qiagen)	Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG-Antikörper aus Schaf (Amersham Biosciences)

2.1.6. Verwendete Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs Inc. (Frankfurt) bezogen.

Weitere verwendete Enzyme waren: Alkalische Phosphatase (Roche), Lambda Protein Phosphatase (NEB), T4-Ligase, (NEB) und Taq DNA Polymerase (Roche).

2.2. Methoden

2.2.1. Transformationen

2.2.1.1. Transformation von *E. coli* - Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* - Zellen und der anschließenden Transformation von Plasmiden erfolgte nach der Rubidiumchlorid - Methode von Hanahan *et al.* (1995).

2.2.1.2. Transformation von *S. cerevisiae* - Zellen

Die Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* - Zellen und die anschließende Transformation von Plasmiden wurde in Anlehnung an die Methode von Klebe *et al.* (1983) in der modifizierten Form von Dohmen *et al.* (1991) durchgeführt.

2.2.1.3. Transformation von *S. pombe*

Die chromosomale Integration diverser PCR - Produkte oder konstruierter Deletionskassetten (s. 2.2.1.4) in das Genom von *S. pombe* erfolgte nach der Lithium - Acetat - Methode von Okazaki *et al.* (1990). Dabei ist zu beachten, dass die zu transformierenden Zellen im Vollmedium (YE5S) und nicht wie im Protokoll beschrieben in Minimalmedium angezogen wurden. Transformanden wurden nach einer zweistündigen Regeneration in ½ -fach YE5S auf Vollmedium, welches je nach Resistenzgen Hygromycin, G418-Sulfat oder CloneNAT enthielt, ausplattiert.

Die Transformation von Plasmiden in *S. pombe* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Okazaki *et al.* (1990). Auch hier wurden die Zellen in Vollmedium (YE5S) angezogen. Die Regeneration der Zellen nach dem Hitzeschock erfolgte für 30 min bei 30 °C in ½ -fach YE5S. Anschließend wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf für den Selektionsmarker des Plasmides spezifischem Medium ausplattiert.

2.2.1.3.1. Herstellung von *S. pombe* - Deletionsstämmen

Die Konstruktion von *S. pombe* - Deletionsstämmen wurde in Anlehnung an die Methode von Bähler *et al.* (1998), welche auf der „One-Step-Gene-Replacement“ - Methode von Rothstein *et al.* (1983) basiert, durchgeführt. Diese Methode wird im Folgenden am Beispiel der Deletion des *ssp2⁺* - Gens, wie in Abb. 2.1 schematisch dargestellt, beschrieben. Hierfür wurden PCR - Produkte mit einem homologen Bereich von 80 Nukleotiden zum *ssp2⁺* - Gen von dem Plasmid pFA6a-kanMX6 mit den unter 2.1.4.2 angegebenen Oligonukleotiden erzeugt. Um größere homologe Bereiche und damit eine höhere Transformationseffizienz zu erreichen, wurde das durch PCR erzeugte $\Delta ssp2::KanMX6$ - Deletionskonstrukt in den linearisierten Vektor pKS11, welcher unter anderem für das *ssp2⁺* - Gen kodiert, homolog rekombiniert. Dabei wurde der offene Leserahmen des *ssp2⁺* - Gens durch Rekombination mit dem für die G418 - Resistenz vermittelnden Markergen ersetzt. Anschließend konnte aus dem resultierenden Plasmid (pKS12) mittels der Restriktionsendonukleasen *SphI* und *Asp718I* das $\Delta ssp2::KanMX6$ - Deletionskonstrukt mit größeren homologen Bereichen zu den flankierenden Bereichen des *ssp2⁺* - Gens erhalten werden. Dieses wurde wie unter 2.2.1.3 beschrieben in den *S. pombe* - Wildtypstamm transformiert. Die Überprüfung der korrekten Deletion erfolgte über PCR - Analyse.

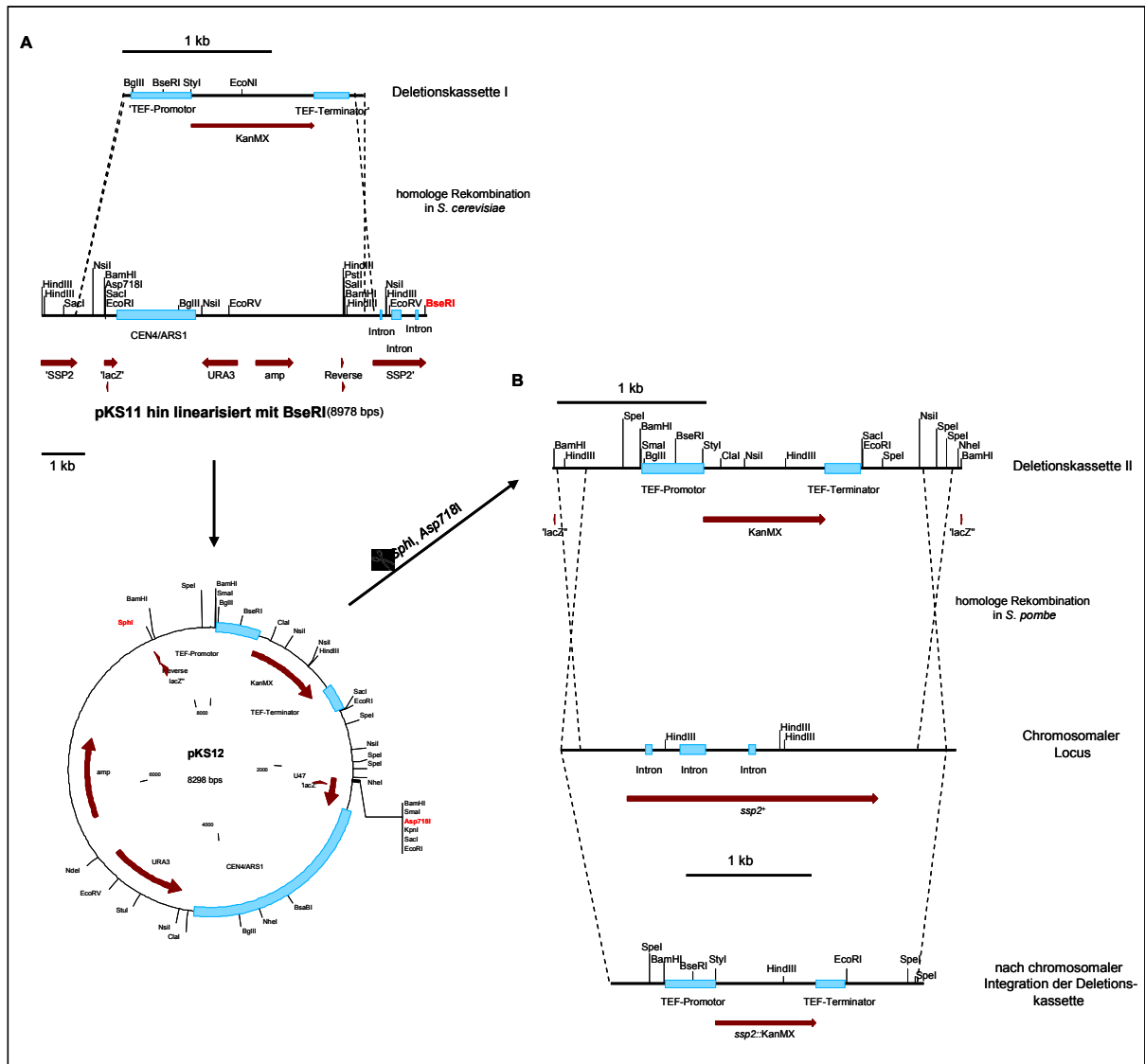


Abbildung 2.1: Fließschema zur Konstruktion eines *S. pombe* - Deletionsstammes am Beispiel des *ssp2*⁺ - Gens.

2.2.1.3.2. Konstruktion chromosomal kodierter Fusionsproteine

Die Konstruktion chromosomal kodierter Fusionsproteine in *S. pombe* erfolgte nach der Methode von Bähler *et al.* (1998). Durch diese Methode wurden Stämme hergestellt, in denen die für die zu untersuchenden Proteine kodierenden Gene genomisch am 3'-Ende mit Sequenzen fusioniert sind, welche entweder für ein 13myc - Epitop, ein 3HA - Epitop oder für ein „TAP-Tag“ - Epitop kodieren. Die Überprüfung der korrekten chromosomalen Integration der für die Epitope kodierenden Sequenz erfolgte über PCR - Analyse. Nach erfolgreicher Integration wurden die Fusionsproteine auf ihre Expression und Nachweisbarkeit mittels Westernanalyse ebenso wie auf ihre Funktionalität getestet (s. Anhang, Abb. 8.1).

2.2.2. Tetradenanalyse von *S. pombe* - Zellen

Zur Tetradenanalyse von *S. pombe* - Zellen wurden zwei frisch ausgestrichene, haploide Stämme mit verschiedenem Paarungstyp in sterilem H₂O gemischt und auf eine Malzagarplatte aufgetropft. Bei erfolgter Tetradenbildung (ca. 2 - 4 Tage bei 30 °C oder RT) wurden diese mittels einer Impföse auf YE5S - Platten ausgestrichen. Am Mikromanipulator (Singer Instruments MSM) wurden die Tetraden zunächst vereinzelt und für weitere 3 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend konnten die im Asci enthaltenen vier Sporen vereinzelt werden. Zur Überprüfung des Aufspaltungsverhältnisses der verschiedenen Marker wurden die ausgekeimten haploiden Sporen auf eine frische YE5S - Platte ausgestrichen und nach 24 h Inkubation bei 30 °C auf die für die Marker entsprechenden Selektions - Platten abgestempelt. Um den Paarungstyp der vier einzelnen Sporen zu ermitteln, wurden diese mit dem haploiden Wildtyp Sp34 (*h*) gekreuzt. Falls dabei Tetraden entstanden, entsprach der Paarungstyp der haploiden Spore *h*⁺. Bei Sporen, welche durch die Kreuzung von Deletionsstämmen mit Paarungsdefekt gebildet wurden, wurde über PCR - Analyse der Paarungstyp bestimmt.

Vor der Tetradenpräparation von Deletionsstämmen, welche einen Paarungsdefekt aufweisen, musste ein das Deletionsgen enthaltene Plasmid in den entsprechenden Stamm transformiert werden.

2.2.3. Bestimmung der Paarungseffizienz von *S. pombe* - Zellen

Zur Bestimmung der Paarungseffizienz von *S. pombe* - Zellen wurden frisch ausgestrichene, haploide Stämme für 18 h bei 30°C in YE - Medium angezogen. Anschließend wurden 2×10^7 Zellen mit der gleichen Menge an Wildtypzellen von gegensätzlichem Paarungstyp gemischt, mit sterilem H₂O gewaschen und auf Malzextraktplatten getropft. Die Platten wurden für 48 h bei 25 °C inkubiert und anschließend einer Jodfärbung, die eine in den Sporen akkumulierende amyloseähnliche Substanz anfärbt, unterzogen (Leupold, 1955). Anhand der Stärke der Jodfärbung wurde die Anzahl der sich bildenden Sporen qualitativ bestimmt.

Zur Quantifizierung der Sporenbildung wurden $2,5 \times 10^6$ ungefärbte Zellen und Sporen in 1 ml sterilem H₂O resuspendiert und mit 3 µl Glusulase (Perkin Elmer®) behandelt. Nach Inkubation der Proben für 17 h bei RT wurden verschiedene Verdünnungen auf YE - Nährböden ausgestrichen und für 5 - 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Anzahl der ausgekeimten Kolonien entspricht der Anzahl der gebildeten Sporen.

2.2.4. Test auf Zellwandstabilität von *S. pombe* - Zellen

Zur Überprüfung der Zellwandstabilität von *S. pombe* - Zellen wurden die zu testenden Stämme über Nacht bei 30 °C in YE - Medium angezogen, auf eine OD₆₀₀ = 0,15 in dem entsprechenden Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,6 bei 30 °C inkubiert. Die Zellernte (10×10^6 Zellen) erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 3.000 rpm (25 °C, Kühlzentrifuge Eppendorf 5810R). Nach einmaligem Waschen mit sterilem TE - Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA)

wurde das Zellpellet in 10 ml einer 300 µg/ml Zymolyase-20T - Lösung (MP Biomedicals, Stammlösung: 10 mg/ml Zymolyase-20T in sterilem TE - Puffer) resuspendiert und bei RT inkubiert. Die Änderung der OD₆₀₀ in Abhängigkeit der Zeit wurde als Maß der Zellwandlyse verwendet.

2.2.5. Erstellung serieller Verdünnungsreihen zur Wachstumsanalyse

Für Komplementationsanalysen und zur phänotypischen Charakterisierung konstruierter Deletionsstämme wurden serielle Verdünnungsreihen der zu testenden Stämme erstellt. Diese wurden über Nacht bei 30 °C in Voll- bzw. Selektivmedium angezogen, anschließend auf eine OD₆₀₀ = 0,2 in dem entsprechendem Medium verdünnt und für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Zur Wachstumsanalyse wurden Tropfen von 3 µl aufgetropft, die dann 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen enthalten sollten. Für die Erstellung der entsprechenden Verdünnungen wurde davon ausgegangen, dass 10⁷ Zellen/ml einer OD₆₀₀ von 1 entsprechen.

Tabelle 2.12: Für die Tropftests eingesetzten Kohlenstoffquellen.

Kohlenstoffquelle	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Ethanol (p.A.)	99,8 %	3 %
Galaktose	20 %	2 %
Glukose	20 % und 30 %	2 % und 3 %
Glycerin	50 %	3 %
Raffinose (sterilfiltriert)	20 %	2 %

Tabelle 2.13: Für die Tropftests eingesetzten Chemikalien.

Chemikalie	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Sorbitol	keine	1M
Canavanin	5 mg/ml, frisch angesetzt	20 und 60 µg/ml
2-DOG	10 mg/ml, frisch angesetzt	70, 150 und 200 µg/ml
Ethionin	12,5 mg/ml, frisch angesetzt	60 und 80 µg/ml
Natriumchlorid	keine	0,2 M
Wasserstoffperoxid	0,3 %	3 mM
Thiabendazol	10 mg/ml	7, 15 und 20 µg/ml

2.2.6. Präparation von DNA

2.2.6.1. Isolierung von Plasmid - DNA aus *E. coli* mittels „Alkalische Lyse“

Die Isolierung von Plasmid - DNA aus *E. coli* erfolgte in Anlehnung an die „alkalische Lyse“ - Methode von Sambrook *et al.* (1989). Die Zellen einer 1,5 ml Übernachtskultur wurden geerntet und in 300 µl P1 (100 µg/ml RNaseA in 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl P2 (20 mM NaOH, 1 % SDS) und vorsichtigem Invertieren, erfolgte die Zugabe von 300 µl 3 M Kalzium - Acetat - Lösung (pH 5,5). Anschließend wurden die in der Lösung enthaltenen Proteine durch eine 15 - minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) gefällt. Darauf folgend wurde der Überstand abgenommen und

die darin enthaltene DNA durch die Zugabe von 600 µl Isopropanol für 15 min bei 13.000 rpm (Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) gefällt. Das daraus resultierende Zellpellet wurde an der Luft getrocknet und anschließend zur Entfernung verbleibender RNA für 20 min bei 37 °C mit 100 µl RNase - Lösung (150 mM Na-Acetat, 1 mg/ml RNaseA in P1) inkubiert. Die Zugabe von 5 µl 3 M Na-Acetat-Lösung und 250 µl 96 %iger Ethanol bewirkte eine Ausfällung der Plasmid - DNA bei 15 - minütiger Zentrifugation (13.000 rpm, Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R). Die gefällte DNA wurde an der Luft getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) aufgenommen.

2.2.6.2. Isolierung von Plasmid - DNA aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmid - DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach der Methode von Robzyk and Kassir (1992). Hierfür wurden 1,5 ml einer stationären Hefekultur, die über Nacht unter selektiven Bedingungen gewachsen waren, geerntet (5 min, 5.000 rpm, RT, Eppendorf Microfuge). Anschließend wurden die Zellen in 100 µl STET (8 % Sucrose, 50 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA, 5 % TritonX-100) resuspendiert und durch die Zugabe von 0,2 g Glasperlen (ø 0,45 mm) aufgeschlossen (5 min; Vibrax VXR basic, IKA). Nach einer weiteren Zugabe von 100 µl STET folgte ein dreiminütiges Aufkochen bei 96 °C. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 10.000 rpm, Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R). Zur Präzipitation chromosomaler DNA wurden 100 µl des Überstandes mit 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat gemischt und für eine Stunde bei -20 °C inkubiert und dann 10 min bei 13.000 rpm (Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) zentrifugiert. Im Überstand enthaltene Plasmid - DNA wurde durch Zugabe von 200 µl eiskaltem Ethanol und einer anschließenden 15 - minütigen Zentrifugation (13.000 rpm, Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) pelletiert und in 20 µl H₂O gelöst. Um mit der isolierten Plasmid - DNA weitere Analysen durchführen zu können, musste diese erst amplifiziert werden. Dazu wurden 10 µl der erhaltenen Plasmid - DNA für eine *E.coli* - Transformation eingesetzt und anschließend aus *E. coli* isoliert (s. 2.2.4.1).

2.2.6.3. Isolierung von DNA - Fragmenten aus Agarose - Gelen

Zur Isolierung spezifischer DNA - Fragmente nach einer Restriktion wurden diese elektrophoretisch in einem 1 - 2 %igem Agarose - Gel aufgetrennt und unter UV - Licht ($\lambda = 254$ nm) (Biometra Transilluminator TI 1) ausgeschnitten. Die Isolierung des DNA - Fragmentes erfolgte mit Hilfe eines „Gel Extraction Kit“ (D2501-01) der Firma Omega Bio-tek nach Anweisungen des Herstellers.

2.2.6.4. Reinigung von PCR - Fragmenten

Für Klonierungen synthetisierte PCR-Fragmente wurden vor dem weiteren Gebrauch mit Hilfe des „Gel Extraction Kit“ (D2501-01) der Firma Omega Bio-tek nach Anweisungen des Herstellers gereinigt.

2.2.6.5. DNA - Fällung

Für die chromosomale Integration diverser PCR - Fragmente war es nötig, die in der PCR amplifizierte DNA zu konzentrieren. Dazu wurden 10 µl 3 M Na-Acetat und 250 µl 96 %igen Ethanol pro 100 µl PCR - Ansatz zugegeben, vermischt und 20 min bei 13.000 rpm (Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets wurde dieses in 20 - 30 µl TE - Puffer (10 mM TrisHCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen und für wenige Minuten bei 37 °C gelöst.

2.2.7. Enzymatische Modifikationen von DNA

2.2.7.1. DNA-Restriktion

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden die DNA - Lösungen mit dem vom Hersteller angegebenen Puffer versetzt. Jeder Ansatz enthielt 1 µg DNA, 2 - 4 U Restriktionsendonuklease, 10 % des zum Enzym gehörenden Puffers und H₂O. Die Reaktionen wurden bei der für die Restriktionsendonuklease optimalen Restriktionstemperatur für 2 h durchgeführt.

2.2.7.2. Dephosphorylierung linearisierter DNA

Um zu verhindern, dass linearisierte Vektor - DNA wieder religiert, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase nach Angaben des Herstellers (Roche) entfernt. Zur Enzyminaktivierung wurde der Reaktionsansatz 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in einem 1 %iges Agarosegel aufgetrennt, aus welchem nun die linearisierte, dephosphorylierte Vektor - DNA isoliert werden konnte.

2.2.8. Ligationsreaktionen

Die Ligation von DNA - Fragmenten mit linearisierter, dephosphorylierter Vektor - DNA wurde durch Zugabe von 1 U T4 - Ligase (NEB) für eine Stunde bei RT gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Insertionsfragment wurde in fünffacher Konzentration der Vektor - DNA eingesetzt.

2.2.9. Auftrennung von DNA - Fragmenten mittels Gelelektrophoresen

2.2.9.1. Auftrennung in nativen Agarosegelen

Die Analyse von DNA - Fragmenten erfolgte, je nach Größenbereich, über eine elektrophoretische Auftrennung in 1 - 2 %igen Agarosegelen [Agarose (Roche) in 1 x TAE gelöst]. Als Laufpuffer diente 1- fach TAE - Puffer (40 mM Tris pH 8, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA). Für die Längenbestimmung der aufgetrennten DNA - Fragmente, wurde die DNA des Bakteriophagen λ (geschnitten mit *EcoRI* / *HindIII*) als Standard benutzt. Nach Anfärben der Agarose - Gele in einer 0,001 %igen (w/v) Ethidiumbromid - Färbelösung konnten die DNA - Fragmente unter UV - Bestrahlung (λ = 254 nm) (Biometra Transilluminator TI 1) sichtbar gemacht werden.

2.2.9.2. Auftrennung von DNA - Fragmenten mittels Polyacrylamid - Gelen

Zur Analyse von DNA - Fragmenten im Längenbereich von 40 - 200 bp wurde ein nichtdenaturierendes Polyacrylamid - Gel verwendet. Hierfür wurde ein 12 %iges Trenngel (4 ml Bis-Acrylamid Rotiphorese30; 2 ml 5 x TAE; 3,93 ml A. dest; 70 µl APS; 5 µl TEMED) verwendet. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die aufzutrennenden DNA - Fragmente mit Blaumarker (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF; 30 % Glycerol) gemischt. Als Laufpuffer diente TAE. Die Auftrennung der DNA - Fragmente erfolgte mit Hilfe des Mini - Protean - Gelsystems (Biorad, München), wobei die Xylencyanol - Bande, welche im Bereich von 70 bp läuft, und die Bromphenolblau - Bande (im Bereich von 20 bp) als Längenindikator genutzt wurden. Anschließend wurde das DNA - Gel in einer 0,001 %igen (w/v) Ethidiumbromid - Färbelösung angefärbt und die DNA unter UV - Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) sichtbar gemacht.

2.2.10. Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

2.2.10.1. Amplifizierung von DNA

Die Polymerase - Kettenreaktion wurde mittels des "Expand High Fidelity PCR Systems" der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Bei PCR - Reaktionen, denen die Klonierung des amplifizierten Fragmentes folgen sollte, wurde der Reaktionsansatz in einem Volumen von 100 µl durchgeführt. Zur Überprüfung der korrekten chromosomalen Integration von Deletionskassetten und verschiedenen „Tags“ wurde ein Reaktionsvolumen von 50 µl gewählt. Standardmäßig wurden eine MgCl_2 - Konzentration von 3 mM, eine Oligonukleotid - Konzentration von 0,3 pmol/µl und eine dNTP - Konzentration von 250 µM gewählt.

Das jeweilige PCR - Programm richtete sich nach dem zu amplifizierenden Fragment. Jedem Programm ging ein fünfminütiger Denaturierungsschritt voraus. Nach diesem wurde die "High fidelity" - Polymerase zugegeben und die PCR mit 25 - 35 Zyklen durchgeführt. Zuerst erfolgte 45 sec die Denaturierung bei 96 °C, dann 2 min, je nach Sequenz und Schmelztemperatur der Oligonukleotide, die Anlagerung der Oligonukleotide an die Ziel - DNA bei 56 - 62 °C. Die Dauer der Elongation wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Fragmentgröße bei einer Temperatur von 72 °C (< 4 kb) bzw. 68 °C (> 4 kb) variiert. Um zu gewährleisten, dass alle synthetisierten Stränge in ihrer Länge vollständig waren, wurde ein abschließender Verlängerungsschritt von 10 min bei 72 °C durchgeführt.

2.2.10.2. Ortsspezifische PCR - Mutagenese mittels „overlap extension“

Die Mutagenese mittels "overlap extension" beruht auf der Polymerase - Kettenreaktion (PCR) und wurde von Ho *et al.* (1989) beschrieben. Das zu mutierende DNA - Fragment wurde zuvor in den Vektor pUC21 kloniert, welches als „Template“ für die PCR - Mutagenese diente. Zwei spezifisch synthetisierte Oligonukleotide (Mutageneseprimer in 5' - bzw. 3' - Richtung) tragen die Sequenz, die die zu mutierende Stelle in der DNA flankiert. Daneben braucht man zwei Oligonukleotide, die

etwas außerhalb des „Templates“ für die PCR - Mutagenese ansetzen und entsprechend in 5'- bzw. 3'- Richtung auf die zu mutierende Stelle gerichtet sind. In einem ersten PCR - Schritt wird aus dem 3'- Mutageneseprimer und dem 5'- flankierenden Oligonukleotid ein Fragment gebildet, welches die Mutation beinhaltet und von der mutierten Stelle bis zu dem 5'- flankierenden Bereich des DNA - Fragmentes reicht. Ein zweiter Ansatz mit dem 5'- Mutageneseprimer und 3'- flankierenden Oligonukleotid synthetisiert ein Fragment, welches auch die Mutation trägt und bis zum 3'- flankierenden Bereich reicht. In einem zweiten PCR - Schritt werden die beiden Fragmente vereinigt und dienen als Matrize für die 3'- und 5'- flankierenden Oligonukleotide, sodass am Ende der PCR die gewünschte Mutation im DNA - Fragment vorliegt. Dieses wurde anschließend gereinigt und in den Vektor pUC21 kloniert. Zur Überprüfung der Sequenz wurde das Plasmid nach erfolgreicher Klonierung von der Firma SeqLab (Göttingen) sequenziert.

2.2.10.3. Herstellung von DIG - markierten DNA - Sonden

DIG - markierte DNA-Sonden wurden nach der „random primed“ Methode hergestellt (Feinberg and Vogelstein, 1983). Dabei wurde der „DIG Luminescent Detection Kit“ der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die Markierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.11. Bestimmung von DNA - Konzentrationen

Die Bestimmung des Gehaltes an μg DNA pro μl erfolgte photometrisch. Dabei wurde die DNA 1:500 mit H_2O verdünnt und die Absorption bei $\lambda = 260\text{nm}$ bestimmt. Um Verunreinigungen durch Proteine zu ermitteln, wurde ebenfalls bei $\lambda = 280\text{ nm}$ gemessen, so dass die Reinheit anhand des Verhältnisses $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ überprüft werden konnte. Als Referenzwert diente eine Quarzküvette mit H_2O .

2.2.12. Sequenzierung von Plasmid - DNA

Die Sequenzierung von Plasmid - DNA wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

2.2.13. RNA - Isolierung aus *S. pombe*

Die Isolierung von Gesamt - RNA erfolgte in Anlehnung an die Methode von Lyne *et al.* (2003). Zur Vermeidung der Degradation von RNA wurden alle Lösungen mit DEPC - behandeltem sterilem H_2O , welches mit 0,1% DEPC versetzt und anschließend autoklaviert wurde, angesetzt. Für die RNA - Extraktion wurden die Zellen einer 50 ml - Übernachtskultur bei einer $\text{OD}_{600} = 0,2$ abfiltriert (Membranfilter von Millipore, $\varnothing 0,45\ \mu\text{m}$) und in flüssigem Stickstoff gefroren. Anschließend wurden die abfiltrierten Zellen bei $-80\ ^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurde die RNA wie im Protokoll von Lyne *et al.* (2003) angegeben, isoliert. Dabei ist zu beachten, dass die Präzipitation der RNA bei $-20\ ^\circ\text{C}$ über Nacht erfolgte.

2.2.13.1. Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA

Die Bestimmung des Gehaltes an RNA pro μl erfolgte photometrisch. Dabei wurde die RNA 1:100 mit DEPC - H_2O verdünnt und die Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Als Referenzwert diente eine Quarzküvette mit DEPC - H_2O . Um Verunreinigungen durch Proteine zu ermitteln, wurde ebenfalls bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen, sodass die Reinheit anhand des Verhältnisses $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ überprüft werden konnte. Bei einer reinen RNA - Lösung liegt dieses Verhältnis bei 2,0. Zusätzlich wurde die Absorption bei $\lambda = 320 \text{ nm}$ bestimmt, da ein hoher Wert auf weitere Kontaminationen hinweist. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.13.2. Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Vor der weiteren Verwendung wurden die Qualität und eine eventuell vorliegende Degradation der Gesamt - RNA mittels eines 1%igen Agarosegels überprüft. Anschließend konnte, aufgrund der Ethidiumbromideinlagerung, die Auftrennung der RNA in 18S und 28S rRNA Untereinheiten (dominante Banden) unter UV - Bestrahlung dokumentiert werden.

2.2.14. „Northern Blot“

Mit dem „Northern Blot“ lässt sich eine bestimmte RNA in einem Gesamt - RNA - Gemisch nachweisen. Dabei werden RNA - Moleküle, die gelelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt wurden, auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Diese RNA kann über markierte DNA - / RNA - Sonden nachgewiesen werden.

2.2.14.1. Agarose - Gelelektrophorese von RNA

Von jeder RNA - Probe wurden $5\mu\text{g}$ eingesetzt und jede Probe 1:2 mit einem RNA - Probenpuffer (Sigma R4268) bis zu einem maximalen Gesamtvolumen von $30 \mu\text{l}$ versetzt. Eine Denaturierung der RNA - Proben und $5 \mu\text{l}$ digoxigeniertem RNA - Marker (0,3 - 6,9 kb; Roche) erfolgte für 10 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$. So wird sichergestellt, dass alle RNA - Moleküle entfaltet und linear vorliegen. Anschließend wurden die Proben auf Eis / EtOH abgekühlt und in einem 1,5%igen Formaldehyd - Agarosegel (nach Angaben von Lyne *et al.*, 2003) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS. Nach 10 min bei 95 V wurde die Gelkammer (Mini Trans-Blot Electrophoretic Cell, BioRad) vollständig mit 1-fach MOPS (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA) gefüllt und die Elektrophorese für eine Stunde und 20 min bei 90 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel unter UV - Licht dokumentiert und für 20 min in 0,05 M NaOH und zur Entfernung des Formaldehyds zweimal in 20 x SSC (3 M NaCl; 0,3 M tri-Natriumcitrat Dihydrat) gewaschen.

2.2.14.2. Kapillarblot

Der Transfer der RNA auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht mittels eines Kapillarblots (Abb. 2.2). Anschließend wurde die Nylonmembran 30 min bei 120 °C inkubiert. Zur Vermeidung von Salzkristallen auf der Membran nach dem Backen wurde diese nach dem „Blotten“ in 2-fach SSC gewaschen. Nach Fixierung der RNA auf der Nylonmembran konnte diese bei 4 °C gut verschlossen aufbewahrt werden.

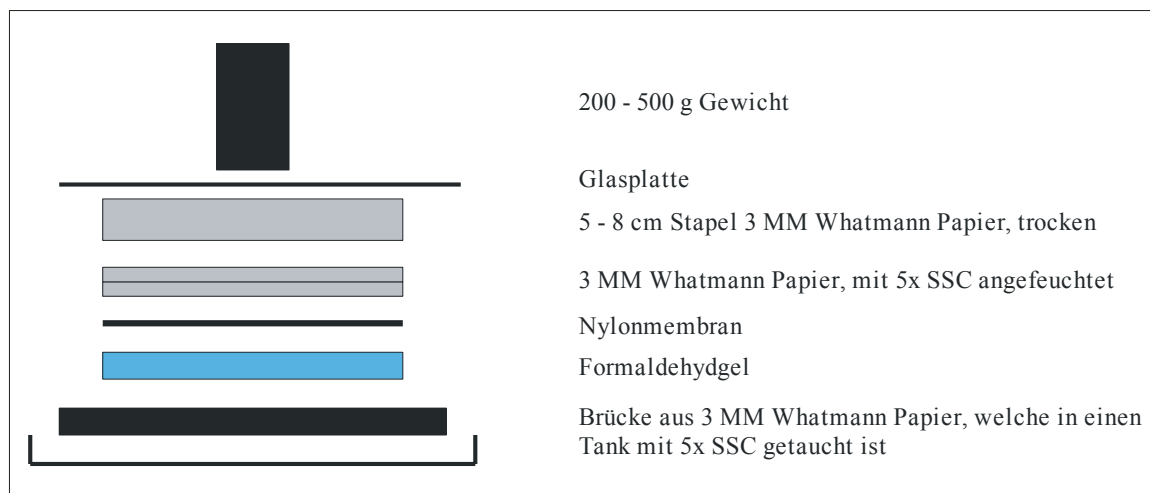


Abbildung 2.2: Aufbau des Kapillarblots. Modifiziert nach „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ (Roche, 2003).

2.2.14.3. Hybridisierung und Detektion der transferierten RNA

Die Nylonmembranen wurden in Hybridisierungsröhrchen gegeben und für 30 min mit je 20 ml Prähybridisierungslösung („DIG Easy Hyb Granules“ der Firma Roche) im Hybridisierungssofen bei 50 °C inkubiert. Während der Prähybridisierung wurden 3 µl DNA - Sonde/ml Hybridisierungslösung („DIG Easy Hyb Granules“ der Firma Roche) 5 min bei 95 °C denaturiert und auf Eis / EtOH kurz abgekühlt. Anschließend wurde die denaturierte DNA - Sonde zur vorgewärmten Hybridisierungslösung pipettiert und durch vorsichtiges Invertieren mit dieser vermischt. Die Prähybridisierungslösung wurde von der Membran entfernt und die Sonde dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 50 °C.

Zur Detektion der gebundenen Sonde wurde ein Antikörper - Konjugat (Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragments, Roche) verwendet, welches spezifisch an Digoxigenin bindet. Um überschüssige Sonde von der Membran zu entfernen, erfolgten mehrere Waschschrte. Die Membranen wurden zweimal für 5 min bei RT mit „Low Stringency Buffer“ (2 x SSC; 0,1 % SDS) und zweimal für 15 min bei 50 °C mit „High Stringency Buffer“ (0,1 x SSC; 0,1 % SDS) gewaschen. Die anschließende Detektion wurde nach Anweisung des „DIG Luminescent Detections Kits“ der Firma Roche durchgeführt.

2.2.15. Proteinanalytik

2.2.15.1. Zellernte und - aufschluss zur Gewinnung von Hefe - Rohextrakten

Hierzu wurden die Stämme über Nacht bei 30 °C in Vollmedium angezogen, anschließend auf eine $OD_{600} = 0,2$ in dem entsprechendem Medium verdünnt und für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Aus dieser logarithmisch wachsenden Vorkultur wurde die Hauptkultur so angeimpft, dass sie am nächsten Morgen bei einer OD_{600} von 0,8 (falls nicht anders angegeben) geerntet werden konnte. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 4 min bei 4.000 rpm (4°C, Kühlzentrifuge Eppendorf 5810R). Nach einmaligem Waschen mit sterilem H₂O wurde das Zellpellet in 300 µl Lysispuffer (2,42 g Tris pH 7,6; 8 g NaCl; 0,5 % Tween20; 10 % Glycerin) aufgenommen. Zur Vermeidung der Proteindegradation und Dephosphorylierung der im Rohextrakt enthaltenen Proteine enthielt der Lysispuffer 1- fach Protease - Inhibitoren - Mix („Complete protease inhibitor cocktail tablets“ der Firma Roche) und 1- fach Phosphatase - Inhibitoren - Mix (10 mM NaF, 10 mM NaN₃, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 10 mM Tetrasodiumpyrophosphat, 10 mM β- Glycerolphosphat). Mittels Glasperlen (ø 0,45 mm) erfolgte der Zellaufschluss für 45 min bei 4 °C auf dem „Vibrax VXR basic“ (IKA). Dann wurde der Überstand in ein neues Eppendorf - Einmalreaktionsgefäß überführt und die Glasperlen mit 300 µl Lysispuffer mit Inhibitoren (1- fach Protease -, Phosphatase - Inhibitoren - Mix) gewaschen und mit dem ersten Überstand vereinigt. Um möglichst den kompletten Überstand zu erhalten, wurde das Eppendorf - Einmalreaktionsgefäß angestochen, kurz abzentrifugiert und der restliche Extrakt mit den anderen Überständen vereinigt. Diese wurden nochmals 4 min bei 4.000 rpm bei 4 °C (Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) zentrifugiert. Die geklärten Überstände wurden in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

2.2.15.1.1. Gewinnung von Hefe - Rohextrakten zum Nachweis der phosphorylierten Form von Tsc1 und Tsc2 in *S. pombe*

Hierzu wurden die Stämme über Nacht bei 30 °C in Vollmedium angezogen, anschließend auf eine $OD_{600} = 0,2$ in dem entsprechendem Medium verdünnt und für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Aus dieser logarithmisch wachsenden Vorkultur wurde die Hauptkultur so angeimpft, dass sie am nächsten Morgen bei einer OD_{600} von 0,8 geerntet werden konnte. Zum Ernten wurden die Zellen 4 min bei 4.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert (Kühlzentrifuge Eppendorf 5180R). Nach einmaligem Waschen mit sterilem H₂O wurde das Zellpellet einmal in 300 µl Lysispuffer mit Inhibitoren (1- fach Protease-, Phosphatase - Inhibitoren - Mix) und in 300 µl Lysispuffer mit 1- fach Protease - Inhibitoren - Mix aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.2.15.1 beschrieben.

2.2.15.1.2. Gewinnung von Hefe - Rohextrakten zum Nachweis der phosphorylierten Form von Ssp2 und Ppk9 in *S. pombe*

Um die phosphorylierte Form des Ssp2 - und Ppk9 - Proteins in *S. pombe* nachzuweisen, wurden die Stämme über Nacht bei 30 °C in Voll- bzw. Minimalmedium angezogen, anschließend auf eine $OD_{600} = 0,15$ in dem entsprechendem Medium verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 30 °C inkubiert. Aus dieser logarithmisch wachsenden Vorkultur wurde die Hauptkultur angeimpft und bis zur gewünschten OD_{600} kultiviert (s. Ergebnisteil). Zur Analyse der Phosphorylierung des Ssp2 - Proteins unter verschiedenen Stressbedingungen wurden die Zellen bei einer $OD_{600} = 0,5$ in den entsprechenden Medien umgesetzt und nach vorher festgelegten Zeitpunkten geerntet (s. Ergebnisteil). Zum Ernten wurden die Zellen abfiltriert (Membranfilter von Millipore, \varnothing 0,45 μ m), in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurde das Zellpellet der jeweiligen Probe in 500 μ l Lysispuffer mit Inhibitoren (1-fach Protease -, Phosphatase - Inhibitoren - Mix) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte wie unter 2.2.15.1 beschrieben.

2.2.15.2. Proteinbestimmung nach der Bradford - Methode

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wässriger Lösungen erfolgte mit dem „BioRad Bradford - Reagenz“ nach der Methode von Bradford (1976). Hierfür wurden 4 μ l einer 1:10 verdünnten Proteinlösung mit 200 μ l Bradford - Reagenz versetzt und mit sterilem H₂O auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve ermittelt.

2.2.15.3. Immunpräzipitation von Proteinen

Zu untersuchende Proteine, welche im Rohextrakt nicht detektierbar waren, wurden sofort nach der Gewinnung des Rohextraktes und der Proteinbestimmung mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert. Je nach Versuchsbedingungen wurden 500 μ g/ml - 3 mg/ml Gesamtprotein in 1 ml Lysispuffer für die Immunpräzipitation eingesetzt. Dieser Extrakt wurde mit 2 μ l des spezifischen Antikörpers (anti-HA, anti-myc) beladen und für 30 min auf einem Rad bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden der Probe 20 μ l ProteinG - Sepharose (Sigma P-3296) zugefügt. Die Präzipitation des Proteins erfolgte für 1,5 h oder über Nacht mittels des spezifischen Antikörpers an die Matrix auf einem Rad bei 4 °C. Für die Immunpräzipitation eines „TAP“ - getaggen Proteins wurde der Extrakt mit 20 μ l IgG - Sepharose (Amersham Biosciences) versetzt und für 2 h oder über Nacht auf einem Rad bei 4 °C inkubiert. Um unspezifisch an die Sepharose gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Präzipitate dreimal für 3 min bei 3.000 rpm (4 °C, Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) in 1 ml Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose mit einer 25 μ l - Spritze der Firma Hamilton trocken gesaugt, in 20 μ l

zweifach Probenpuffer für 5 min bei 1.400 rpm gekocht (96 °C) und direkt für die „Westernblot“-Analyse eingesetzt.

Zum Nachweis der phosphorylierten Form des Tsc1 - und des Tsc2 - Proteins mittels anti-Serin - und anti-Threonin - Antikörper wurden 4 bzw. 7 mg/ml Gesamtprotein vor der Immunpräzipitation für 1 h entweder mit CLB40-Sepharose (Tsc1-TAP) oder mit ProteinG - Sepharose (Tsc2-13myc) inkubiert, um unspezifische Bindungen von Proteinen an die Sepharose zu vermindern („Preclearing“). Nach Entfernung der zugegebenen Sepharose durch Zentrifugation wurde aus diesem Extrakt das Tsc1 - bzw. Tsc2 - Protein immunpräzipitiert (s. oben).

2.2.15.4. Dephosphorylierung von Proteinen

Zum Nachweis der Phosphorylierung des Ssp2 - Proteins wurden 6 mg Gesamtprotein mittels des anti-myc - Antikörpers immunpräzipitiert. Anschließend wurde die Sepharose siebenmal für 3 min bei 3.000 rpm (4 °C, Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) in 1 ml Lysispuffer gewaschen. Zur Dephosphorylierung des Ssp2 - Proteins wurde das Immunpräzipitat mit λ -Phosphatase nach Angaben des Herstellers (NEB) inkubiert und im Anschluss dreimal für 3 min bei 3.000 rpm (4 °C, Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R) in 1 ml Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose mit einer 25 μ l - Spritze der Firma Hamilton trocken gesaugt, in 20 μ l zweifach Probenpuffer für 5 min bei 1.400 rpm gekocht (96°C) und direkt für die „Westernblot“-Analyse eingesetzt.

2.2.15.5. Untersuchung von Proteininteraktionen mittels Ko - Immunpräzipitation

Die Ko - Immunpräzipitation von Proteinkomplexen erfolgte aus Heferohextrakten mit 2 μ l des angegebenen Antikörpers (s. Ergebnisteil) und 20 μ l ProteinG - Sepharose bzw. IgG -Sepharose. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 4 °C wurde die Sepharose siebenmal mit Lysispuffer gewaschen und die Protein - Protein - Assoziation in einem Immunblot analysiert.

2.2.15.6. Präparation von subzellulären Fraktionen aus *S. pombe* - Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisation des Tsc1 - und Tsc2 - Fusionsproteins wurde eine Zellfraktionierung mittels differentieller Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurden die Stämme bei einer OD₆₀₀ von 0,8 geerntet und der Rohextrakt gewonnen. Von beiden Stämmen wurden jeweils 20 μ g Gesamtprotein für die Zellfraktionierung eingesetzt. Zuerst wurde der Rohextrakt bei 8.000 x g für 5 min zentrifugiert (1. LP), um den Nukleus, unaufgebrochene Zellen und Bestandteile des Zytoskeletts zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand für 5 min bei 12.000 x g zentrifugiert (2. LP). Der postnukleare Überstand wurde bei 75.000 x g für 45 min zentrifugiert (Beckman Coulter). Der Überstand (400 μ l, SN), welcher der zytoplasmatischen Fraktion entspricht, wurde abgenommen, mit 4 μ l Probenpuffer (5x) versetzt und für 5 min bei 1.400 rpm gekocht (96 °C). Das Pellet, welches die Membranfraktionen enthielt, wurde in 18 μ l Probenpuffer (2x) resuspendiert und für 30 min bei 600 rpm (37°C) inkubiert. Als Kontrolle für die

Gesamtmenge der jeweiligen Proteine wurde 20 mg Gesamtprotein in 20 µl Gesamtvolumen (RE) mit 4 µl fünffach Probenpuffer versetzt und 5 min bei 1.400 rpm gekocht (96 °C). Alle Proben wurden direkt für die „Westernblot“ - Analyse eingesetzt.

2.2.15.7. Nachweis spezifischer Proteine durch „Westernblot“ - Analyse

2.2.15.7.1. SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden 1,8%ige Sammelgele (Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris pH 6,8; 8 mM EDTA; 0,4 % SDS) und 7,5%ige SDS - Polyacrylamid - Gele (Trenngelpuffer: 1,5 M Tris pH 8,8; 8 mM EDTA; 0,4 % SDS) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in Mini - Protean - Gelsystemen (Biorad, München) bei einer konstanten Spannung von 90 V. Zur Einordnung der apparenten Molekulargewichte diente der Proteinstandard „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (10 -170 kDa) der Firma Fermentas. Nach vollendetem Gellauf wurde das Sammelgel entfernt und die Proteine mittels des Nass - Blot - Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

2.2.15.7.2. Transfer und Detektion der Proteine

Die Proteine wurden im Nass - Blot - Verfahren mit Hilfe einer „Mini Trans - Blot Electrophoretic Transfer Cell“ (Biorad) auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Whatman) mit einer Porengröße von 0,45 µm transferiert. Der Transfer mittels Blotpuffer (25 mM Tris; 152 mM Glycin; 20 % Methanol; 0,1 % SDS) erfolgte für zwei Stunden bei 25 V.

Bevor die Nitrocellulosemembran mit Antikörpern behandelt wurde, erfolgte zunächst eine Inkubation mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST - Puffer (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20) für eine Stunde bei RT, um die Membran mit Protein zu sättigen und somit eine unspezifische Bindung der Antikörper auf der Blotmembran zu verhindern. Anschließend folgte die Bindung des primären Antikörpers (s. 2.1.5) in TBST - Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver über Nacht bei 4 °C. Nach Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper wurde diese dreimal fünf Minuten in TBST - Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Bindung des sekundären Antikörpers (s. 2.1.5) in TBST - Puffer entweder mit 5 % (w/v) Magermilchpulver oder mit 5 % (w/v) BSA eine Stunde bei RT. Es folgten wieder drei Waschschrte à fünf Minuten mit TBST - Puffer, denen sich zwei Waschschrte à fünf Minuten in TBS - Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl) anschlossen.

2.2.15.7.2.1. Detektion von Proteinen mittels Chemilumineszenz

Zum Nachweis der transferierten Proteine mittels Chemilumineszenz wurde ein Peroxidase - gekoppelter sekundärer Antikörper verwendet, so dass mit Hilfe von Peroxidase - Reaktionen eine Detektion der Antikörperbindung möglich war. Nach zweiminütiger Inkubation der Membran mit 2 ml Chemilumineszenzsubstrat (ECLTM Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare) wurde die Membran auf Röntgenfilm (HyperfilmTM, Amersham Biosciences) exponiert.

2.2.15.7.2.2. Detektion und Quantifizierung von Proteinen mit Hilfe des „Odyssey Imager“

Des Weiteren wurde zum Nachweis der transferierten Proteine der „Odyssey Imager“ (LI-COR biosciences, Lincoln USA) verwendet. Hierbei ist an den sekundären Antikörper ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der bei einer Wellenlänge von 700 nm oder 800 nm angeregt wird, so dass die Signalintensitäten der emittierten Fluoreszenz gescannt und quantifiziert werden kann. Zur Quantifizierung der detektierten Banden wurde die „Odyssey 2.1 software“ (LI-COR biosciences, Lincoln USA) verwendet.

2.2.15.8. TAP - Reinigung von Tsc1 und Tsc2

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von Tsc1 und Tsc2 wurde das Tsc1- bzw. Tsc2-TAP - Fusionsprotein in einer Variation der Methode von Puig *et al.* (2001) aufgereinigt. Bei der TAP - Reinigung wird die Eigenschaft von ProteinA, sich an IgG - Sepharose zu binden, ausgenutzt. In dem „TAP - Tag“ ist neben der ProteinA Domäne noch eine, durch eine TEV - Protease Schnittstelle getrennte Calmodulin - Bindedomäne vorhanden. Durch die Affinität von Calmodulin - Bindedomänen zu Calmodulin - „Beads“ wird eine weitere Reinigung des mit dem „TAP - Tag“ fusionierten Proteins erlaubt.

2.2.15.8.1. Herstellung von Hefe - Rohextrakten

Zur Gewinnung von Hefe - Rohextrakten wurden die *S. pombe* - Stämme über Nacht bei 30 °C in Vollmedium angezogen, auf eine $OD_{600} = 0,2$ in dem entsprechendem Medium verdünnt und für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Aus dieser logarithmisch wachsenden Vorkultur wurden 4 l Hauptkultur angeimpft und über Nacht bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ angezogen. Anschließend wurde die Zellkultur für 30 min auf Eis gekühlt. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation für 10 min bei 5.000 rpm (4 °C, Beckman Coulter Avanti J-25, Rotor: JA-10). Nach einmaligem Waschen mit sterilem H₂O wurde das Zellpellet in 10 ml Lysispuffer mit Inhibitoren (1- fach Protease -, Phosphatase - Inhibitoren - Mix) aufgenommen. Mittels Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) erfolgte der Zellaufschluss in einem „beat beater“ (Biospec Products) für 7 x 30 s mit zweiminütiger Pause zwischen den einzelnen Zyklen. Anschließend wurde der Rohextrakt von den Glasperlen getrennt. Diese wurden mit 8 ml Lysispuffer mit Inhibitoren gewaschen und das Lysat mit dem vorher abgenommenen Rohextrakt wieder vereinigt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 4.000 rpm (4 °C, Kühlzentrifuge Eppendorf 5810R) wurde der Überstand von dem Pellet getrennt. Das Pellet wurde zweimal mit 4 ml Lysispuffer mit Inhibitoren gewaschen und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung nach der Bradford - Methode wie unter 2.2.15.2 beschrieben.

2.2.15.8.2. Reinigung von Tsc1- und Tsc2-TAP

Die Reinigung des Tsc1 - bzw. des Tsc2-TAP - Fusionsproteines erfolgte mit 1 ml IgG - Sepharose, welche in Lysispuffer mit Inhibitoren äquilibriert wurde, unter Schwenken über Nacht (4 °C), um eine Bindung des TAP - Fusionsproteins an die Matrix zu ermöglichen. Nach Durchlauf des Rohextraktes in einer Säule (BioRad) wurde die Matrix viermal mit Lysispuffer, einmal mit „TEV cleavage buffer“ (10 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 %Tween 20, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT) und Lysispuffer im Verhältnis 1:1 und einmal mit „TEV cleavage buffer“ gewaschen. Anschließend wurde die Matrix für 2 h unter Schwenken mit 1,5 ml „TEV cleavage buffer“ mit 75 U TEV - Protease (Ac TEV™ Protease, Invitrogen™ life technologies) bei 16 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde das TEV geschnittene Tsc1 - bzw. Tsc2 - Fusionsprotein eluiert und die Matrix mit 500 µl „TEV cleavage buffer“ gewaschen, wobei diese Waschfraktion dem vorherigen Eluat zugeführt wurde. Zur weiteren Aufreinigung der Fusionsproteine wurde dem Eluat 6 ml „IPP150 calmodulin binding buffer“ (10 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 %Tween 20, 1 mM MgAc, 1 mM Imidazol, 2 mM CaCl₂) und 3 µl 1 M CaCl₂/ml Eluat zugegeben und in eine Säule mit 400 µl Calmodulin - „Beads“ (Calmodulin Affinity Resin, Stratagene), welche mit „IPP150 calmodulin binding buffer“ äquilibriert wurden, für 5 h bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Calmodulin - „Beads“ mit 30 ml „IPP150 calmodulin binding buffer“ gewaschen und in ein Eppendorf - Einmalreaktionsgefäß überführt. Nach anschließender Zentrifugation (3 min, 300 rpm, 4 °C) wurde der Überstand von den Calmodulin - „Beads“ mit einer 25 µl - Spritze (Hamilton) abgetrennt. Um Tsc1 bzw. Tsc2 sowie mögliche an das Tsc1 - bzw. Tsc2 - Protein gebundene Proteine von den Calmodulin - „Beads“ zu lösen, wurden diese in 30 µl zweifach und 10 µl fünffach Probenpuffer aufgenommen. Da nicht bekannt ist, ob zytoplasmatische und / oder Membranproteine an Tsc1 oder Tsc2 binden, wurden die Calmodulin-„Beads“ unter Schütteln sowohl bei 37 °C (600 rpm) als auch bei 96 °C (1.400 rpm) denaturiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und in ein neues Eppendorf - Einmalreaktionsgefäß überführt. Zum Nachweis möglicher ko - eluierender Proteine des Tsc1 - bzw. Tsc2 - Proteins wurde der Überstand in einem 10 %igen SDS - Polyacrylamid - Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung angefärbt.

2.2.15.8.3. Silberfärbung

Um das Tsc1 - bzw. Tsc2 - Protein sowie mögliche ko - eluierende Proteine zu detektieren, wurde die Silberfärbung nach Shevchenko *et al.* (1996) durchgeführt.

2.2.16. Messung der Argininaufnahme mittels L-[³H]-Arginin

Hierzu wurden die zu untersuchenden Stämme über Nacht bei 30 °C in EMM - Medium ohne Aminosäuren angezogen, anschließend auf eine OD₆₀₀ = 0,2 in dem entsprechenden Medium verdünnt und für weitere 4 h bei 30 °C inkubiert. Aus dieser logarithmisch wachsenden Vorkultur wurde die Hauptkultur so angeimpft, dass am nächsten Morgen bei einer OD₆₀₀ von 0,5 die

Messung der L-[³H] - Argininaufnahme, in Anlehnung an van Slegtenhorst *et al.* (2004), durchgeführt werden konnte. Dabei wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in 600 µl EMM - Medium ohne Aminosäuren aufgenommen und mit 1µCi L-[³H] - Arginin sowie 100 µM nicht - radioaktivem Arginin versetzt. Nach definierten Zeitpunkten (s. Ergebnisteil) wurden dem Ansatz jeweils 200 µl entnommen. Zum Ernten der Zellen wurde diese abfiltriert (Nitrocellulosefilter von Millipore; ø 0,45 µm) und mit sterilem H₂O gewaschen. Nach Trocknung der Filter wurden diese in einem Szintillationsgefäß (Roth) mit 1 ml Szintillationsflüssigkeit (EcoLumeTM Liquid Scintillation Fluid, MP Biomedicals) versetzt. Anschließend wurde die Radioaktivität und somit die Aufnahme von L-[³H] - Arginin in einem „Scintillation Counter“ (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2300TR, Packard Bioscience Company) gemessen.

3. Ergebnisse

Die Regulation des Zellwachstums ist ein hochkontrollierter Prozess. Ein Signalweg, der das Zellwachstum bei sich ändernden Nährstoff - und Wachstumsfaktoren - Konzentrationen reguliert, ist der TOR - Signaltransduktionsweg. Da es sich im Säugersystem als sehr kompliziert erweist, die einzelnen Nährstoff - und Wachstumsfaktor - induzierten Signale aufzuschlüsseln, wurde der einzellige Modellorganismus *S. pombe* zur Analyse dieses Signaltransduktionsweges verwendet. Im Gegensatz zu Säugern muss *S. pombe* keine durch Wachstumsfaktoren - induzierten Signale verarbeiten, hingegen aber die Adaption des Zellwachstums an das Nährstoffangebot. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit war bereits bekannt, dass in *S. pombe in vivo* auch ein TSC - Komplex existiert (Matsumoto *et al.*, 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten auch in *S. pombe* die Regulation des TOR - Signaltransduktionsweges durch den TSC - Komplex zeigen. Jedoch liegen noch keine Untersuchungen über die Regulation des TSC - Komplexes selbst in *S. pombe* vor. Daher sollte die vorliegende Arbeit einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der Aktivität des TSC - Komplexes in *S. pombe* liefern.

3.1. Biochemische Charakterisierung von Tsc1 und Tsc2

3.1.1. Posttranslationale Modifikationen von Tsc1 und Tsc2

In Säugern wird die Aktivität des TSC - Komplexes durch verschiedene Phosphorylierungen innerhalb des TSC1 - oder des TSC2 - Proteins moduliert (Tabelle 1.1). Um Rückschlüsse auf eine mögliche Phosphorylierung des Tsc1 - und Tsc2 - Proteins in *S. pombe* zu gewinnen, erfolgte ein Vergleich der Proteinsequenz des menschlichen TSC1 und TSC2 mit den Proteinsequenzen des Tsc1 bzw. Tsc2 von *S. pombe*. Dieser zeigt, dass keine der *in vivo* bekannten Phosphorylierungsstellen des menschlichen TSC1 in *S. pombe* konserviert sind (Abb. 3.1 A). In Abb. 3.1 B ist eine Auswahl der *in vivo* nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen (S540, S664, T1227, S1704 und S1798) des menschlichen TSC2 dargestellt (Ma *et al.*, 2007, 2005; Inoki *et al.*, 2003). Unter diesen ist durch ERK phosphoryliertes S664 (entspricht S678), durch die AMPK α phosphoryliertes T1227 (entspricht T1046) und S1704 (entspricht S1260) in *S. pombe* konserviert (Abb. 3.1 B).

Aufgrund der Konservierung der Phosphorylierungsstellen S678, T1046 und S1260 innerhalb des Tsc2 - Proteins und der Tatsache, dass auch die Sequenz der Tsc1 - Proteine in *S. pombe* sehr viele potentielle Phosphorylierungsstellen aufweist, wurde in einem nächsten Ansatz die Phosphorylierung von Tsc1-TAP und Tsc2-13myc mittels „Westernblot“ - Analyse in *S. pombe* untersucht. Die *S. pombe* - Stämme, die das Tsc1-TAP - bzw. das Tsc2-13myc - Fusionsprotein produzieren, zeigten kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, was belegt, dass diese Fusionsproteine vollständig funktionell sind (Anhang, Abb. 8.1 A + B). Zur Untersuchung der Phosphorylierung des Tsc1 - bzw. des Tsc2 - Proteins diente der Wildtypstamm, welcher diese Fusionsproteine nicht produziert, als Negativkontrolle. Aufgrund dessen sollte in diesem Immunpräzipitat kein Signal nach Inkubation mit Antikörpern, welche spezifisch an phosphorylierte Serin - oder Threoninreste binden, detektierbar sein. Wie in Abb. 3.1 C zu

erkennen ist, erfolgte in der Negativkontrolle keine Detektion der Fusionsproteine. Des Weiteren wurden sowohl das Tsc1 - als auch das Tsc2 - Fusionsprotein mit den Phospho - Threonin - / Phospho - Serin - Antikörpern detektiert. Folglich wird auch in *S. pombe* sowohl das Tsc1 - als auch das Tsc2 - Protein *in vivo* phosphoryliert.

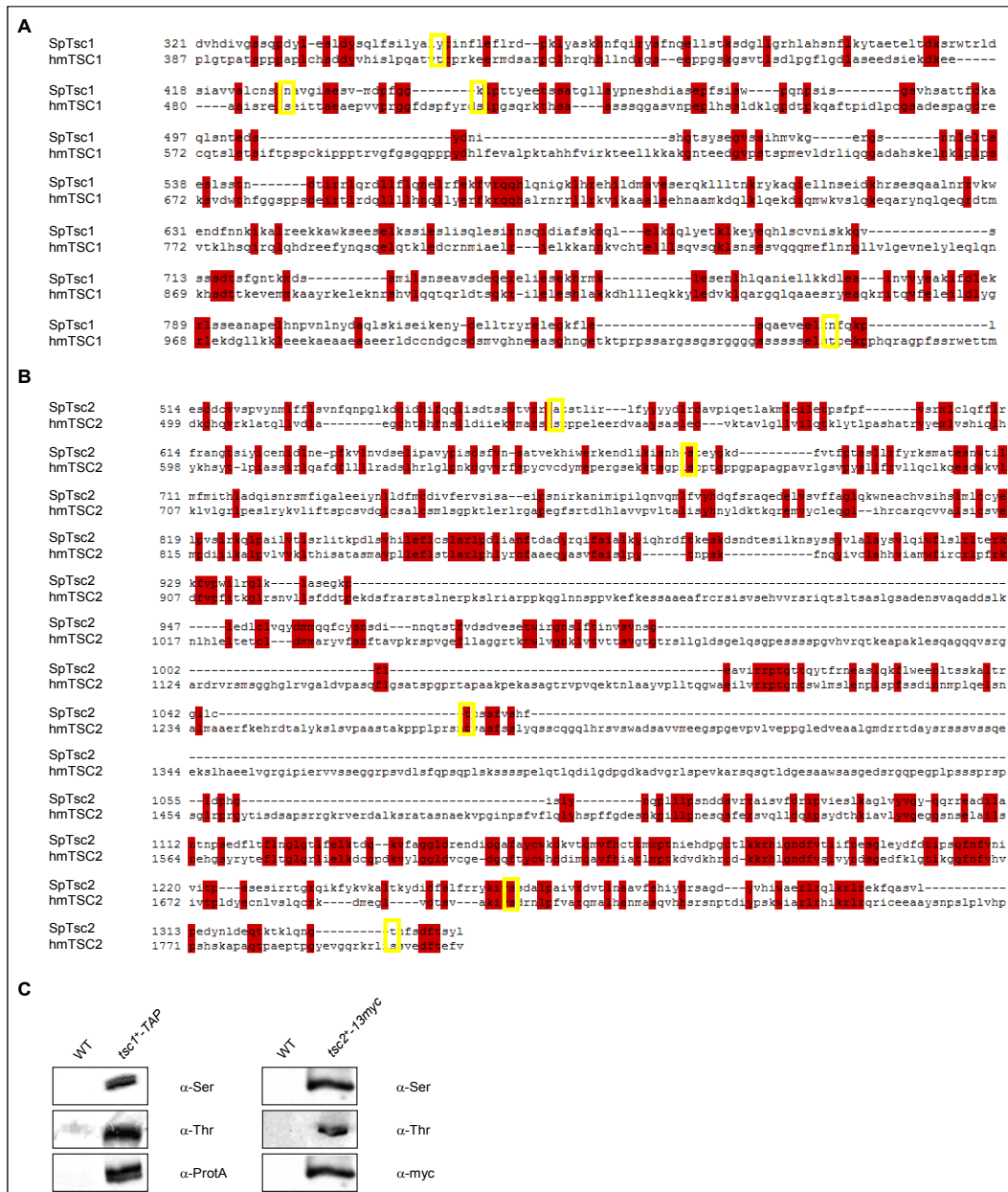


Abbildung 3.1: Konservierung der Phosphorylierungsstellen und Nachweis der Phosphorylierung von Tsc1 und Tsc2. **A:** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz von Tsc1 aus *S. pombe* (SpTsc1) sowie des menschlichen TSC1 - Proteins (hmTSC1). In rot hervorgehoben sind die Bereiche mit identischer Proteinsequenz. Gelb umrandet sind die *in vivo* nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen des menschlichen TSC1. Keine der bekannten Phosphorylierungsstellen des menschlichen TSC1 ist in *S. pombe* konserviert. **B:** Dargestellt ist ein Ausschnitt der Aminosäuresequenz von Tsc2 aus *S. pombe* (SpTsc2) sowie des menschlichen TSC2 - Proteins (hmTSC2). In rot hervorgehoben sind die Bereiche mit identischer Proteinsequenz. Gelb umrandet ist eine Auswahl der *in vivo* nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen (S540, S664, T1227, S1704 und S1798) des menschlichen TSC2. Unter diesen ist durch ERK phosphoryliertes S664 (entspricht S678), durch die AMPK α phosphoryliertes T1227 (entspricht T1046) und S1704 (entspricht S1260) in *S. pombe* konserviert. Als Grundlage für den Sequenzvergleich wurde die Blossum 62 Matrix verwendet. **C:** Zum immunologischen Nachweis der phosphorylierten Form des Tsc1 - und Tsc2 - Proteins wurden Rohextrakte in Lysispuffer mit Inhibitoren der *S. pombe* - Stämme WT (972) und *tsc1⁺-TAP* (SPKS8-1C) und *tsc2⁺-13myc* (SPKS10-1A) hergestellt. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 8 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. Mittels IgG - Sepharose wurde Tsc1-TAP, mittels anti-myc und ProtG - Sepharose Tsc2-13myc immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden bei 96 °C für 5 min in SDS-Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte mit dem anti-Serin - und anti-Threonin - Primäntikörper. Zur Kontrolle der Expression des Tsc1-TAP und Tsc2-13myc - Fusionsproteines erfolgte die Detektion mit dem anti-protA - Primäntikörper. Das erwartete Molekulargewicht von Tsc1-TAP entspricht ~109 kDa, das von Tsc2-13myc ~173 kDa.

3.1.2. Nachweis der subzellulären Lokalisation von Tsc1 und Tsc2 mittels differentieller Zentrifugation

Trotz umfangreicher Arbeiten an den TSC - Proteinen in Säugern ist deren Lokalisation in der Zelle letztlich widersprüchlich beschrieben. So konnte eine Lokalisation von TSC2 in den Membranstapeln des Golgi - Apparates nachgewiesen werden (Wienecke *et al.*, 1996). Eine andere Studie zeigte, dass TSC1 und TSC2 im Zytoplasma kolokalisieren und eine transiente Membranassoziation aufweisen (van Slegtenhorst *et al.*, 1998). Andere Arbeiten deuten darauf hin, dass TSC2 in den Nukleus transloziert wird (Lou *et al.*, 2001) oder dass TSC1 und TSC2 in allen Zellkompartimenten vorliegen (Yamamoto *et al.*, 2002). Dies wirft die Frage auf, worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind. Mögliche Gründe können zum Beispiel in dem Entwicklungsstadium der Zelle oder in den verwendeten Zelllinien begründet sein. In einigen Fällen können aber auch Artefakte durch Überexpression der beiden Proteine vorliegen. In *S. pombe* ist die Lokalisation von Tsc1 und Tsc2 bisher noch unbekannt. Um Rückschlüsse auf die Lokalisierung in *S. pombe* zu gewinnen, wurde eine Fraktionierung des Zelllysates mittels differentieller Zentrifugation durchgeführt. Die Analyse der jeweiligen Fraktionen demonstrierte, dass Tsc1 und Tsc2 vorwiegend in der zytoplasmatischen Fraktion (SN), aber auch in geringem Anteil in der Membranfraktion (HP) lokalisieren (Abb. 3.2).

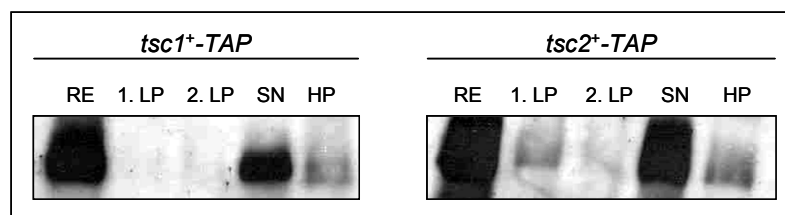


Abbildung 3.2: Lokalisierung von Tsc1 und Tsc2 in *S. pombe*. Die Herstellung der SPKS8-1C (*tsc1⁺-TAP*) und SPKS9-1A (*tsc2⁺-TAP*) Rohextrakte erfolgte in Lysispuffer mit Inhibitoren. Die Trennung von Zellbestandteilen hoher Dichte (1. LP, 2. LP) und der Membranfraktion (HP) vom Zytosol (SN) erfolgte mittels differentieller Zentrifugation. Die dazu eingesetzte Proteinkonzentration betrug 2 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 200 µl Lysispuffer mit Inhibitoren. Mittels IgG - Sepharose wurde Tsc1-TAP und Tsc2-TAP immunpräzipitiert. Zum Vergleich wurden ebenfalls Rohextrakte mit einer Proteinkonzentration von 400 µg/ml immunpräzipitiert (RE). Die Präzipitate des Rohextraktes, des 1. LP, 2. LP sowie der SN - Fraktion wurde bei 96 °C für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert, die Membranfraktion für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden alle Proben in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem anti-protA - Primärankörper. Das erwartete Molekulargewicht von Tsc1-TAP entspricht ~109 kDa, das von Tsc2-TAP ~160 kDa.

Es ist bekannt, dass die subzelluläre Lokalisierung des TSC - Komplexes eine entscheidende Rolle in der Ausübung seiner Funktion als negativer Regulator des TOR - Signalweges spielt. In Säugern wird zum Beispiel nach Stimulation der Zelle mittels Wachstumsfaktoren die zytoplasmatische Lokalisation von TSC2 durch Akt veranlasst (Rosner *et al.*, 2007). In *Drosophila* wird der dTSC - Komplex über die Bindung von Mcted an dTsc1 an die Zellmembran rekrutiert. In Folge dessen ist die AMPK α , ähnlich wie in Säugern, in der Lage dTsc2 nach eintretender Energielimitation zu phosphorylieren, was wiederum in einer Aktivierung des dTSC - Komplexes resultiert (Teleman *et al.*, 2005). Aufgrund der Konservierung des TOR - Signalweges wäre eine Regulation der Aktivität

des TSC - Komplexes über die subzelluläre Lokalisierung in *S. pombe* durchaus denkbar. Da *S. pombe* keine Wachstumsfaktor - induzierten Signale, hingegen aber Nährstoff - induzierte Signale verarbeiten muss, wurde in einem ersten Ansatz die Lokalisierung von Tsc1 und Tsc2 in der Zelle in Anwesenheit des toxischen Glukoseanalogons 2-DOG analysiert. In Säugern wird dieses wie Glukose in die Zelle transportiert, jedoch kann es nicht über die Glykolyse metabolisiert werden (Gee *et al.*, 1974; Mukkada and Bonventre, 1975). Dies resultiert in einer eintretenden Energielimitation und zu einem erhöhten AMP / ATP - Verhältnis, wobei über AMP die AMPK α in Säugerzellen aktiviert wird (Inoki *et al.*, 2003a). In *S. pombe* wurde bereits in der *tsc1* Δ - und *tsc2* Δ - Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber 2-DOG im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen (persönliche Mitteilung, A. Dierkes). Zur Untersuchung der Lokalisation von Tsc1 und Tsc2 erfolgte eine differentielle Fraktionierung der Zellbestandteile von Zellkulturen, welche mit einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ 2-DOG für zwei Stunden behandelt wurden. Die Zugabe von 2-DOG (t_0) mit einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ führt bereits nach zwei Stunden zu einem verminderten Zellwachstum des Wildtypes (Anhang, Abb. 8.2 A). Jedoch lagen die mit 2-DOG (200 $\mu\text{g/ml}$) behandelten Zellen bereits vor dem Zellaufschluss zu ca. 50 % lysiert vor und die erzielten Ergebnisse waren nicht interpretierbar (Daten nicht gezeigt; Anhang, Abb. 8.2). Da keine Bedingungen gefunden werden konnten, in denen die Zugabe von 2-DOG zu einem verminderten Zellwachstum, aber nicht zu einer Lyse der Zellen führt, wurde die Lokalisierung des Tsc1 - und Tsc2 - Proteins nach Behandlung mit 2-DOG im Zuge dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Basierend auf verschiedenen Studien wird vermutet, dass sowohl Tsc1 als auch Tsc2 in *S. pombe*, ähnlich wie in Säugern, für die Registrierung und Adaption an Stickstoffhungerbedingungen erforderlich sind (Aspuria and Tamanoi, 2008; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2002). Aufgrund dessen wurde die Lokalisierung von Tsc1 und Tsc2 nach eintretendem Stickstoffhunger untersucht. Die *S. pombe* - Stämme SPKS8-1C (*tsc1*⁺-TAP) und SPKS9-1A (*tsc2*⁺ - TAP) wurden bis zu einer OD₆₀₀ \sim 0,5 in EMM - Medium (+ NH₄Cl +As) angezogen und in EMM - Medium ohne Stickstoff für 24 h umgesetzt. Anschließend wurde die Lokalisation von Tsc1 und Tsc2 mittels der differentiellen Fraktionierung der Zellbestandteile untersucht, jedoch waren die erzielten Ergebnisse nicht reproduzierbar (Abb. 3.3 A + B).

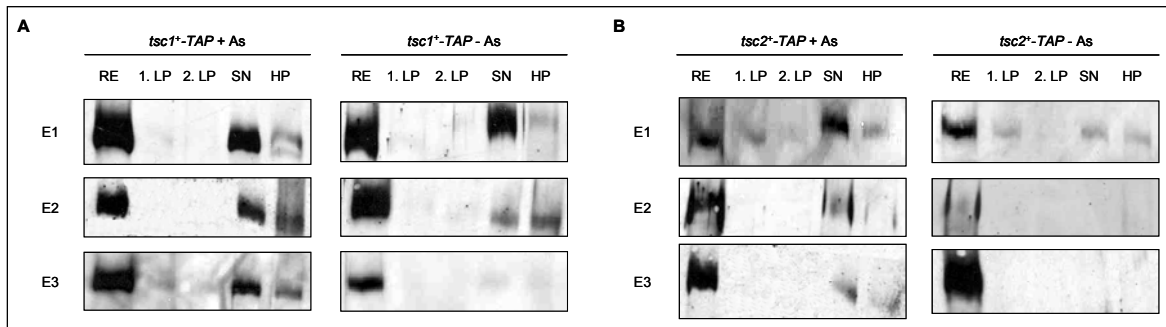


Abbildung 3.3: Lokalisierung von Tsc1 und Tsc2 nach Stickstoffhunger in *S. pombe*. A +B: Die *S. pombe* - Stämme SPKS8-1C (*tsc1*⁺-TAP) (A) und SPKS9-1A (*tsc2*⁺-TAP) (B) wurden bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,6 in EMM - NH₄Cl - Medium mit Aminosäuren (+As) angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen. Des Weiteren wurde die Zellkultur für 24 h in EMM - NH₄Cl - Medium ohne Aminosäuren (-As) umgesetzt und anschließend die Rohextrakte gewonnen. Die Herstellung der Rohextrakte erfolgte in Lysispuffer mit Inhibitoren. Die Trennung von Zellbestandteilen hoher Dichte (1. LP, 2. LP) und der Membranfraktion (HP) vom Zytosol (SN) erfolgte mittels differentieller Zentrifugation. Die dazu eingesetzte Proteinkonzentration betrug 2 µg/µl in einem Gesamtvolumen von 200 µl Lysispuffer mit Inhibitoren. Mittels IgG - Sepharose wurde Tsc1-TAP oder Tsc2-TAP immunpräzipitiert. Zum Vergleich wurden ebenfalls Rohextrakte mit einer Proteinkonzentration von 400 µg/ml immunpräzipitiert (RE). Die Präzipitate des Rohextraktes, des 1. LP, 2. LP sowie der SN - Fraktion wurde bei 96 °C für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert, die Membranfraktion für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurden alle Proben in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem anti-protA - Primärantikörper. Das erwartete Molekulargewicht von Tsc1-TAP entspricht ~109 kDa, das von Tsc2-TAP ~160 kDa. E1 = Experiment 1, E2 = Experiment 2, E3 = Experiment 3.

3.2. Die AMP - aktivierte Kinase (AMPK) in *S. pombe*

Es konnte gezeigt werden, dass in *S. pombe* ein TSC - Komplex existiert (Matsumoto *et al.*, 2002). Jedoch wurden noch keine Untersuchungen zu seiner Regulation durchgeführt. In Säugern wird TSC2 von der 5'-AMP-aktivierten Kinase (AMPK) in Antwort auf Energiemangel phosphoryliert (Inoki *et al.*, 2003a). Durch diese Phosphorylierung wird der TSC - Komplex in seiner Funktion als negativer Regulator des TOR - Signalweges aktiviert. Die AMPK ist als Heterotrimer aktiv und setzt sich aus einer katalytischen α - Untereinheit und den regulatorischen β - und γ - Untereinheiten zusammen. Homologe von allen Untereinheiten konnten in fast allen eukaryotischen Spezies nachgewiesen werden (Miranda-Saavedra *et al.*, 2007; Pan and Hardie, 2002; Gao *et al.*, 1996; Woods *et al.*, 1996; Matsusaka *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1995; Carling *et al.*, 1994; Mitchelhill *et al.*, 1994; Alderson *et al.*, 1991; Anderberg *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1994).

3.2.1. Identifizierung potentieller Untereinheiten der AMPK in *S. pombe*

Eine Regulation des TSC - Komplexes mittels eines AMPK - Homologs in *S. pombe* ist durchaus denkbar. Sowohl Tsc1 als auch Tsc2 werden *in vivo* phosphoryliert (Abb. 3.1 C). Zudem sind die Phosphorylierungsstellen T1227 und S1704 des menschlichen TSC2 - Proteins, welche in Antwort auf Energiemangel durch die AMPK phosphoryliert werden, im Tsc2 - Protein in *S. pombe* konserviert. Aus diesem Grund erfolgte ein Vergleich der Proteinsequenz der α - Untereinheit der menschlichen AMPK α (hmAMPK α) und dem Homologen der AMPK α in *S. cerevisiae* (Snf1) mit den Proteinsequenzen der „open reading frames“ von *S. pombe*. Dieser Vergleich identifizierte das schon beschriebene Ssp2 - und Ppk9 - Protein als potentielle Homologe

für die katalytische Untereinheit der menschlichen AMPK α (Abb. 3.4) (Miranda-Saavedra *et al.*, 2007; Townley and Shapiro, 2007; Kemp *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007; Bimbó *et al.*, 2005; Matsusaka *et al.*, 1995). Die Proteinsequenz von Ssp2 weist 35% Identität zu hmAMPK α 1, 36 % Identität zu hmAMPK α 2 und 43 % Identität zu Snf1 auf. Die Proteinsequenz von Ppk9 weist 30% Identität zu hmAMPK α 1, 29 % Identität zu hmAMPK α 2 und 30 % Identität zu Snf1 auf. Die Identifizierung potentieller Homologe der AMPK in *S. pombe* eröffnet die Möglichkeit neue Signale, die die Involvierung der Ssp2 - und / oder der Ppk9 - Funktion erfordern, zu identifizieren.

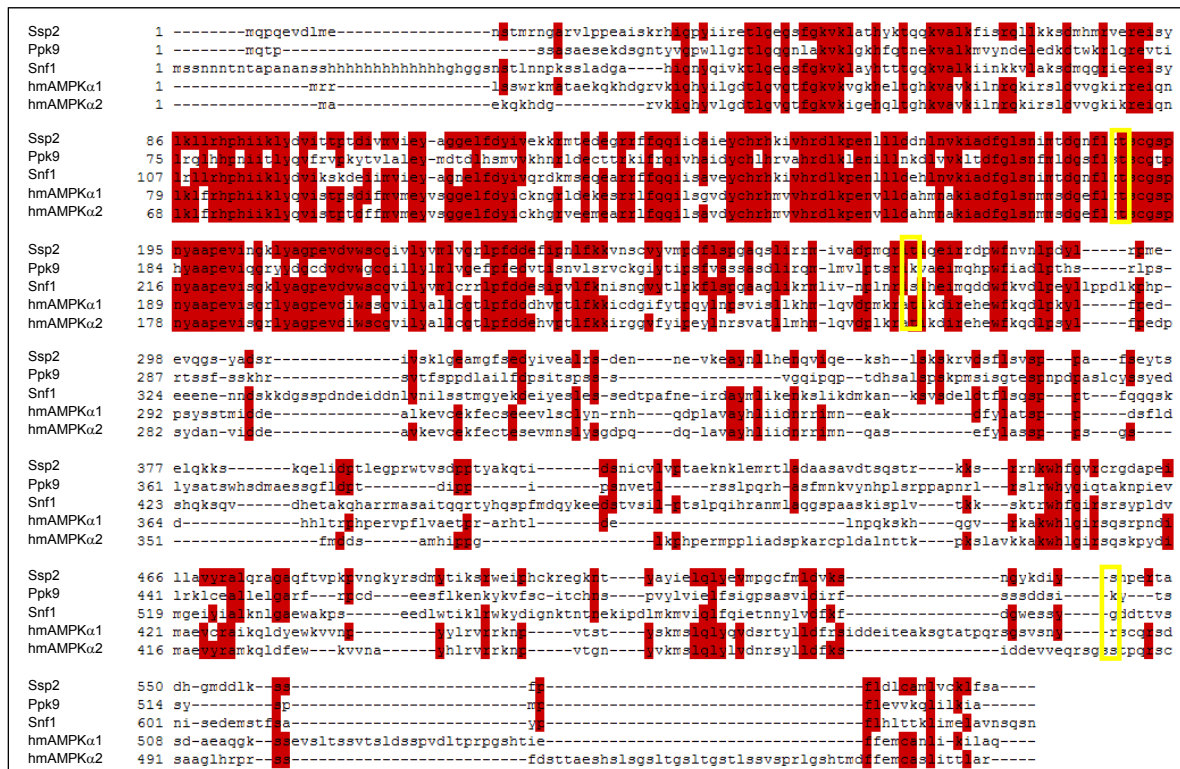


Abbildung 3.4: Sequenzvergleich verschiedener katalytischer AMPK α - Untereinheiten. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der beiden potentiellen katalytischen AMPK α - Untereinheiten Ssp2 und Ppk9 aus *S. pombe*, Snf1 aus *S. cerevisiae* sowie der menschlichen AMPK α 1 und AMPK α 2. In rot hervorgehoben sind die Bereiche mit identischer Proteinsequenz. Gelb umrandet sind die konservierten Phosphorylierungsstellen der menschlichen AMPK α (T172, T258 and S485). Unter diesen ist die Phosphorylierungsstelle T172 von hmAMPK α sowohl in Ssp2 (T189) als auch in Ppk9 (T178) konserviert. Des Weiteren sind in der Proteinsequenz von Ssp2 die Phosphorylierungsstellen T258 und S485 von hmAMPK α konserviert. Als Grundlage für den Sequenzvergleich wurde die Blossum 62 Matrix verwendet.

Da die AMPK als Heterotrimer aktiv ist, wurden ebenfalls die β - und γ -Untereinheit der menschlichen AMPK und denen in *S. cerevisiae* mit den Proteinsequenzen der „open reading frames“ von *S. pombe* verglichen. Dieser Vergleich identifizierte das SPCC1919.03c - Protein als ein potentielles Homologes der β - Untereinheit (Anhang, Abb. 8.3 A). Die Proteinsequenz von SPCC1919.03c weist 28% Identität zu hmAMPK β 1, 30 % Identität zu hmAMPK β 2 und eine Identität von 26 % zu Gal83, von 12 % zu Sip1 und von 27 % zu Sip2 in *S. cerevisiae* auf. Des Weiteren identifizierte der Sequenzvergleich das Cbs2 - Protein als ein potentielles Homologes der γ - Untereinheit (Anhang, Abb. 8.3 B). Die Proteinsequenz von Cbs2 weist 32 % Identität zu

hmAMPK γ 1, 19 % Identität zu hmAMPK γ 2, 22 % Identität zu hmAMPK γ 3 und eine Identität von 49 % zu Snf4 in *S. cerevisiae* auf.

3.2.2. Konservierung des AMPK - Komplexes in *S. pombe*

Das Genom von *S. pombe* weist zwei für das AMPK α - Homolog kodierende Gene und jeweils eins für die regulatorischen Untereinheiten kodierendes homologes Gen auf. Eine potentielle α_1 - Untereinheit wird kodiert von *sps2*⁺, die potentielle α_2 - Untereinheit von *ppk9*⁺, die β - Untereinheit von *SPCC1919.03c*⁺ und die γ - Untereinheit von *cbs2*⁺. Im Verlauf dieser Arbeit konnte durch die Arbeitsgruppe um Townley and Shapiro (2007) mittels Kristallstrukturanalysen die Existenz eines AMPK - Komplexes nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde die Struktur für eine ATP - und eine AMP - gebundene Form des AMPK - Komplexes in *S. pombe* geklärt. Der analysierte Komplex bestand hierbei aus einem Teil der potentiellen α - Untereinheit Sps2 (Aminosäure 440 - 576), einem Teil der potentiellen β - Untereinheit SPCC1919.03c (Aminosäure 205 - 298) und der gesamten potentiellen γ - Untereinheit Cbs2. Jedoch liegen noch keine *in vivo* Untersuchungen des AMPK - Komplexes in *S. pombe* vor. Ist in *S. pombe* die AMPK wie in Säugern als Heterotrimer aktiv, so sollte ebenfalls *in vivo* eine Interaktion der potentiellen Untereinheiten miteinander nachgewiesen werden können. Dieser Nachweis erfolgte mittels einer Ko - Immunpräzipitation der potentiellen Untereinheiten. Für die Ko - Immunpräzipitationen wurden Rohextrakte aus exponentiell wachsenden Zellkulturen, welche entweder die einzelnen Fusionsproteine der Untereinheiten oder beide für die Interaktion zu untersuchenden Fusionsproteine produzieren, gewonnen. Die *S. pombe* - Stämme, welche die jeweiligen Fusionsproteine produzieren, zeigten kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp, was belegt, dass diese Fusionsproteine vollständig funktionell sind (Anhang, Abb. 8.1 C + D).

Durch Immunpräzipitation der jeweiligen α_1 -, α_2 -, β - oder γ - Untereinheit mit den für das fusionierte Epitop spezifischen Primärantikörper bzw. direkt mit IgG - Sepharose im Falle des TAP - Epitopes wurde die jeweilige Untereinheit präzipitiert. In einer anschließende „Westernblot“ - Analyse konnte Sps2 mit SPCC1919.03c (Abb. 3.5 A) und Cbs2 (Abb. 3.5 B) präzipitiert werden. Ebenso konnte Ppk9 mit SPCC1919.03c (Abb. 3.5 C) und Cbs2 (Abb. 3.5 D) präzipitiert werden. Zusätzlich konnte die potentielle regulatorische Untereinheit SPCC1919.03c mit Cbs2 präzipitiert und Cbs2 mit SPCC1919.03c präzipitiert werden (Abb. 3.5 E). Zur Überprüfung, ob jeweils alle drei Untereinheiten in einem Komplex vorliegen, müssten in dem zu untersuchenden *S. pombe* - Stamm alle drei Untereinheiten mit verschiedenen Epitopen fusioniert werden. Da aber in der Studie von Townley and Shapiro (2007) die Existenz eines AMPK - Komplexes gezeigt werden konnte, ist anzunehmen, dass die Untereinheiten Sps2 (α_1), SPCC1919.03c (β) und Cbs2 (γ) und die Untereinheiten Ppk9 (α_2), SPCC1919.03c (β) und Cbs2 (γ) einen Komplex bilden.

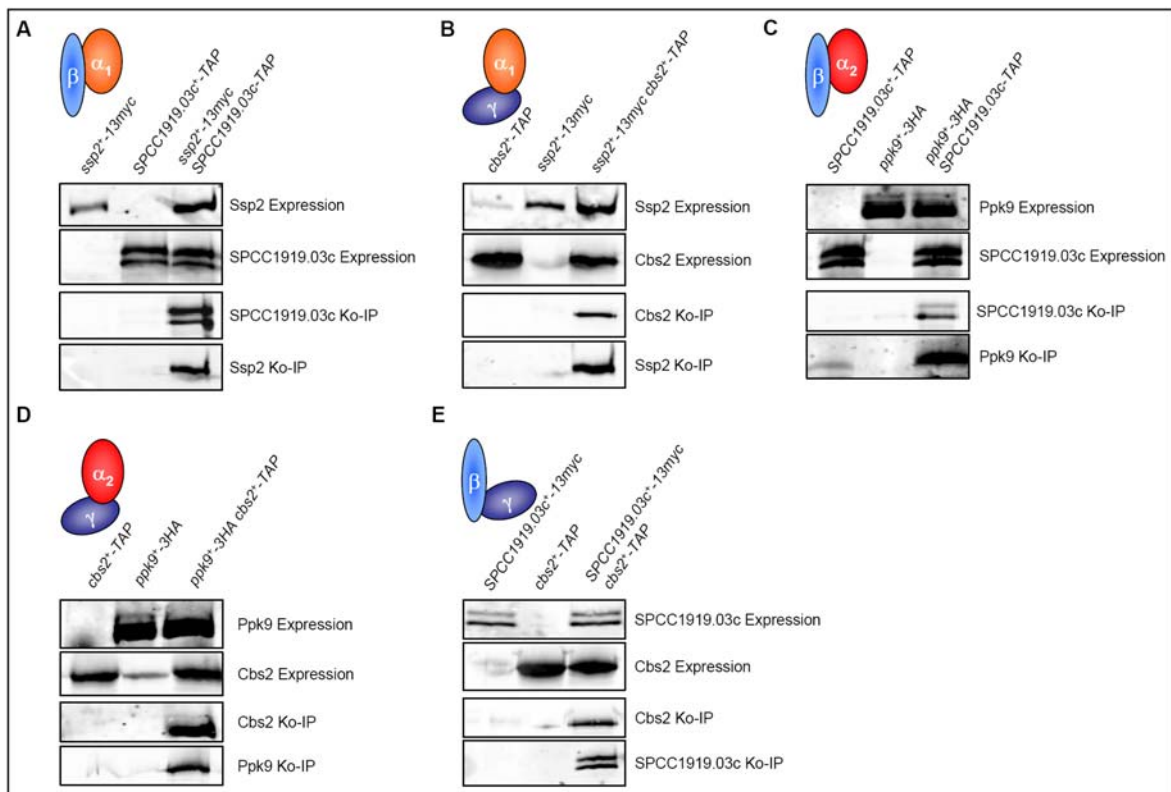


Abbildung 3.5: Ko - Immunpräzipitation (Ko - IP) **A:** Ko - IP der α_1 - (Ssp2) mit der β - Untereinheit der AMPK. Für die Ko - IP wurden Rohextrakte der *S. pombe*- Stämme *SPCC1919.03c⁺-TAP* (SPKS77-1D), *ssp2⁺-13myc* (SPKS19-2C) und *SPCC1919.03c⁺-TAP ssp2⁺-13myc* (SPKS86-2C) in Lysispuffer mit Inhibitoren hergestellt. **B:** Ko - IP der α_1 - (Ssp2) mit der γ - Untereinheit der AMPK. Für die Ko - IP wurden Rohextrakte der *S. pombe*- Stämme *cbs2⁺-TAP* (SPKS82-2A), *ssp2⁺-13myc* (SPKS19-2C) und *cbs2⁺-TAP ssp2⁺-13myc* (SPKS87-3A) in Lysispuffer mit Inhibitoren hergestellt. **C:** Ko - IP der α_2 - (Ppk9) mit der β - Untereinheit der AMPK. Für die Ko - IP wurden Rohextrakte der *S. pombe*- Stämme *SPCC1919.03c⁺-TAP* (SPKS77-1D), *ppk9⁺-3HA* (SPKS78-4C) und *SPCC1919.03c⁺-TAP ppk9⁺-3HA* (SPKS83-1D) in Lysispuffer mit Inhibitoren hergestellt. **D:** Ko - IP der α_2 - (Ppk9) mit der γ - Untereinheit der AMPK. Für die Ko - IP wurden Rohextrakte der *S. pombe*- Stämme *cbs2⁺-TAP* (SPKS82-2A), *ppk9⁺-3HA* (SPKS78-3A) und *cbs2⁺-TAP ppk9⁺-3HA* (SPKS90-3A) in Lysispuffer mit Inhibitoren hergestellt. **E:** Ko - IP der β - mit der γ - Untereinheit der AMPK. Für die Ko - IP wurden Rohextrakte der *S. pombe*- Stämme *cbs2⁺-TAP* (SPKS82-2A), *SPCC1919.03c⁺-13myc* (SPKS81-1D) und *cbs2⁺-TAP SPCC1919.03c⁺-13myc* (SPKS85-6A) in Lysispuffer mit Inhibitoren hergestellt. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem spezifischen Primärantikörper und anschließend mit ProtG - Sepharose bzw. mittels IgG - Sepharose. Das Immunpräzipitat wurde bei 96 °C für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten und der ko - immunpräzipitierten Untereinheiten erfolgte mit den jeweiligen, spezifischen Primärantikörpern. Das erwartete Molekulargewicht von Ssp2-13myc entspricht ~87 kDa, das von Ppk9-3HA ~65 kDa, das von SPCC1919.03c-TAP ~54 kDa, das von SPCC1919.03c-TAP ~53 kDa und das von Cbs2-TAP ~59 kDa.

3.2.2.1. Zusammensetzung des AMPK - Komplexes in einer *ssp2 Δ* - Mutante

Aufgrund des Vorkommens zweier AMPK - Komplexe in *S. pombe*, ist es interessant zu klären, ob mehr Ppk9 - Protein mit der β - oder γ - Untereinheit in der *ssp2 Δ* - Mutante präzipitiert werden kann. Des Weiteren soll untersucht werden, ob Ppk9 das Ssp2 - Protein im AMPK - Komplex I ersetzen und die fehlende Funktion übernehmen kann. Während des Wachstums der jeweiligen *S. pombe* - Stämme unter Normalbedingungen (YE5S - Medium) konnte nicht mehr Ppk9 - Protein mit der β - (SPCC1919.03c) und der γ - Untereinheit (Cbs2) in der *ssp2 Δ* - Mutante immunpräzipitiert werden (Abb. 3.6).

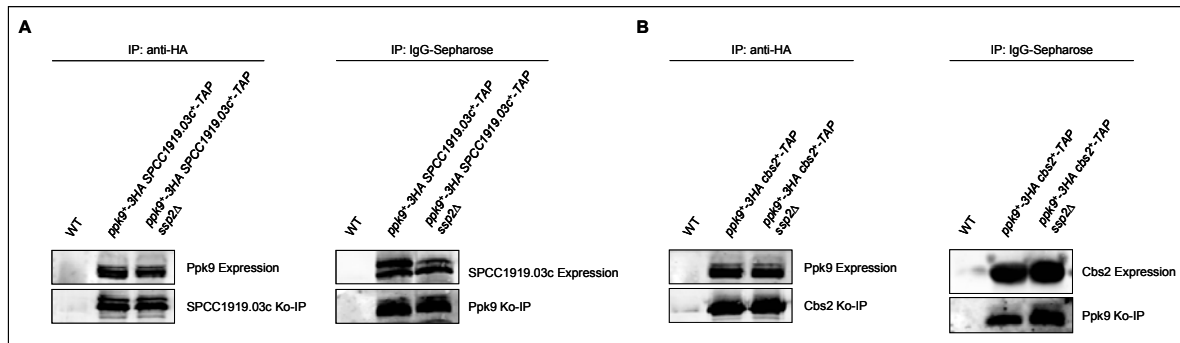


Abbildung 3.6: Ko - Immunpräzipitation (Ko - IP) der α_2 - / β - Untereinheit und der α_2 - / γ - Untereinheit der AMPK in einer *ssp2Δ* - Mutante. A: Die *S. pombe* - Stämme WT (972), *ppk9⁺-3HA SPCC1919.03c⁺-TAP* (SPKS83-2C) und *ppk9⁺-3HA SPCC1919.03c⁺-TAP ssp2Δ* (SPKS97-1B) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ in YE5S - Medium angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen. **B:** Die *S. pombe* - Stämme WT (972), *ppk9⁺-3HA cbs2⁺-TAP* (SPKS90-3A) und *ppk9⁺-3HA cbs2⁺-TAP ssp2Δ* (SPKS96-4B) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ in YE5S-Medium angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem spezifischen Primärantikörper und anschließend mit ProtG - Sepharose bzw. mittels IgG - Sepharose. Das Immunpräzipitat wurde bei 96 °C für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten und der ko - immunpräzipitierten Untereinheiten erfolgte mit den jeweiligen, spezifischen Primärantikörpern. Das erwartete Molekulargewicht von Ppk9-3HA entspricht ~ 65 kDa, das von SPCC1919.03c-TAP ~ 54 kDa und das von Cbs2-TAP ~ 59 kDa.

Da unter Normalbedingungen keine verstärkte Interaktion der Untereinheiten des AMPK - Komplexes II in der *ssp2Δ* - Mutante nachgewiesen werden, erfolgte eine Zellanzucht der jeweiligen *S. pombe* - Stämme unter Hungerbedingungen. Die logarithmisch wachsenden Zellkulturen wurden in EMM NH_4Cl - Medium angezogen und für eine Stunde in stickstoffreies Medium umgesetzt. Anschließend erfolgte die Ko - Immunpräzipitation der jeweiligen Untereinheiten in der *ssp2Δ* - Mutante. Jedoch konnte auch hier nicht mehr Ppk9 - Protein mit der β - (SPCC1919.03c) und der γ - Untereinheit (Cbs2) in der *ssp2Δ* - Mutante immunpräzipitiert werden (Abb. 3.7 A + B). Bei der Zellanzucht in Minimalmedium konnte eine Abnahme der oberen Proteinbande des präzipitierten SPCC1919.03c in der *ssp2Δ* - Mutante beobachtet werden (Abb. 3.7 A II). Dies könnte in möglichen posttranslationalen Modifikationen von SPCC1919.03c begründet liegen, welche in der *ssp2Δ* - Mutante verringert sind.

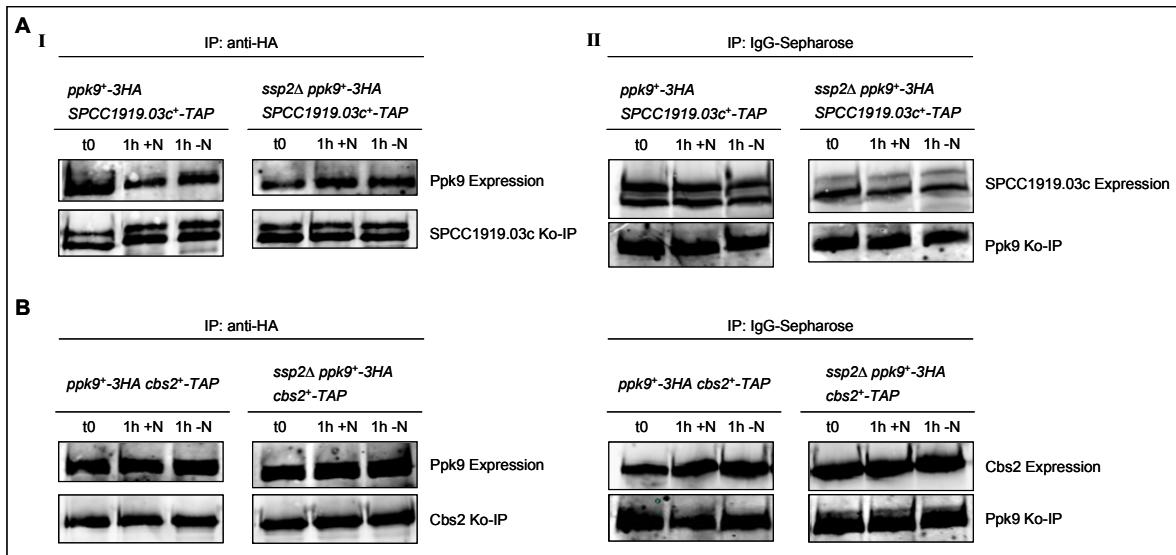


Abbildung 3.7: Ko - Immunpräzipitation (Ko - IP) der α_2 - / β - Untereinheit und der α_2 - / γ - Untereinheit der AMPK in einer *ssp2Δ* - Mutante. A: Die *S. pombe* - Stämme WT (972), *SPCC1919.03c⁺-TAP ppk9⁺-3HA* (SPKS83-2C) und *SPCC1919.03c⁺-TAP ppk9⁺-3HA ssp2Δ* (SPKS97-1B) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ in EMM - Medium mit NH_4Cl angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen (t0). Des Weiteren wurde die Zellkultur für eine Stunde (1h) in EMM NH_4Cl - Medium (+N) und in EMM - Medium ohne Stickstoff (-N) umgesetzt und die Rohextrakte gewonnen. **B:** Die *S. pombe* - Stämme WT (972), *cbs2⁺-TAP ppk9⁺-3HA* (SPKS90-3A) und *cbs2⁺-TAP ppk9⁺-3HA ssp2Δ* (SPKS96-4B) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ in EMM - Medium mit NH_4Cl angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen (t0). Des Weiteren wurde die Zellkultur für eine Stunde (1h) in EMM NH_4Cl - Medium (+N) und in EMM - Medium ohne Stickstoff (-N) umgesetzt und die Rohextrakte gewonnen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem spezifischen Primärantikörper und anschließend mit ProtG - Sepharose bzw. mittels IgG - Sepharose. Das Immunpräzipitat wurde bei $96^\circ C$ für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten und der ko - immunpräzipitierten Untereinheiten erfolgte mit den jeweiligen, spezifischen Primärantikörpern. Das erwartete Molekulargewicht von Ppk9-3HA entspricht ~ 65 kDa, das von SPCC1919.03c-TAP ~ 54 kDa und das von Cbs2-TAP ~ 59 kDa.

3.2.3. Zusammensetzung des AMPK - Komplexes in einer *ppk9Δ* - Mutante

Da in der *ssp2Δ* - Mutante keine Zunahme der Interaktion der Untereinheiten des AMPK - Komplexes II nach Stickstofflimitation nachgewiesen werden konnte, scheinen Ssp2 und Ppk9 getrennte zelluläre Funktionen auszuüben. Ausgehend davon, sollte unter Stickstoffhunger keine verstärkte Interaktion der Untereinheiten des AMPK - Komplexes I in der *ppk9Δ* - Mutante zu beobachten sein. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde eine logarithmisch wachsende Zellkultur in EMM NH_4Cl - Medium angezogen und für eine Stunde in stickstoffreies Medium umgesetzt. Mittels der Ko - Immunpräzipitation der jeweiligen Untereinheiten in der *ppk9Δ* - Mutante konnte das Ssp2 - Protein nicht mehr mit der β - (SPCC1919.03c) und der γ - Untereinheit (Cbs2) immunpräzipitiert werden (Abb. 3.8). Des Weiteren ist die in der *ssp2Δ* - Mutante beobachtete Abnahme einer möglichen posttranslationalen Modifikation des SPCC1919.03c - Proteins nicht zu verzeichnen.

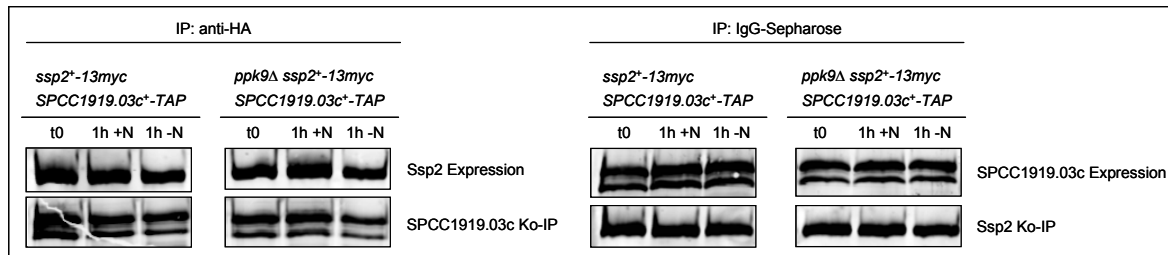


Abbildung 3.8: Ko - Immunpräzipitation (Ko - IP) der α_1 - / β - Untereinheit und der α_1 - / γ - Untereinheit der AMPK in einer *ppk9 Δ* - Mutante. Die *S. pombe* - Stämme *SPCC1919.03c⁺-TAP ssp2⁺-13myc* (SPKS86-2C) und *SPCC1919.03c⁺-TAP ssp2⁺-13myc ppk9 Δ* (SPKS99-3A) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ in EMM - Medium mit NH_4Cl angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen (t0). Des Weiteren wurde die Zellkultur für eine Stunde (1h) in EMM NH_4Cl - Medium mit NH_4Cl (+N) und in EMM - Medium ohne Stickstoff (-N) umgesetzt und die Rohextrakte gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg für die Ko - IP eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem spezifischen Primärantikörper und anschließend mit ProtG - Sepharose bzw. mittels IgG - Sepharose. Das Immunpräzipitat wurde bei $96^\circ C$ für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion der immunpräzipitierten und der ko - immunpräzipitierten Untereinheiten erfolgte mit den jeweiligen, spezifischen Primärantikörpern. Das erwartete Molekulargewicht von Ssp2-13myc entspricht ~ 87 kDa, das von SPCC1919.03c-TAP ~ 54 kDa und das von Cbs2-TAP ~ 59 kDa.

3.2.4. Untersuchungen zur Regulation der AMPK α

3.2.4.1. Konservierung potentieller Phosphorylierungsstellen in der AMPK α

In Säugern wird unter ATP - Mangel AMPK α am T172 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung aktiviert die AMPK α , welche daraufhin das TSC2 - Protein phosphoryliert (Inoki *et al.*, 2003a). Dadurch wird der TSC - Komplex in seiner Rolle als negativer Regulator aktiviert. Mittels proteinbiochemischer Analysen konnte im Zuge dieser Arbeit gezeigt werden, dass in *S. pombe* auch Tsc2 *in vivo* phosphoryliert wird (Abb. 3.1). Des Weiteren konnte die Existenz zweier AMPK - Komplexe in *S. pombe* nachgewiesen werden. Es gibt jedoch noch keine Informationen über eine mögliche Regulation und Aktivierung der AMPK α in *S. pombe*. Wird in *S. pombe* die Aktivität der AMPK - Komplexe in gleicher oder ähnlicher Weise wie in Säugern reguliert, so sollten regulatorische Phosphorylierungsstellen in beiden potentiellen Isoformen der AMPK α (Ssp2, Ppk9) konserviert sein. Ein Aminosäurevergleich der katalytischen α - Untereinheit der menschlichen AMPK (hmAMPK α) mit der Ssp2 - Proteinsequenz zeigt, dass die Phosphorylierungsstelle T172 von hmAMPK α in Ssp2 konserviert ist und dem T189 entspricht (Abb. 3.4). Der Aminosäurevergleich der katalytischen α - Untereinheit der menschlichen AMPK (hmAMPK α) mit der Ppk9 - Proteinsequenz zeigt, dass die Phosphorylierungsstelle T172 von hmAMPK α ebenfalls in Ppk9 konserviert ist und dem T178 entspricht (Abb. 3.4).

In Säugern ist es möglich, die Phosphorylierung am T172 mit Hilfe eines Phospho-AMPK α (T172) - Antikörper zu detektieren. Dieser monoklonale Antikörper detektiert endogenes AMPK α spezifisch, wenn es am T172 phosphoryliert vorliegt (Inoki *et al.*, 2003a). In einem ersten Ansatz sollte überprüft werden, ob dieser Antikörper auch zur Analyse der Phosphorylierung des Ssp2 - Proteins eingesetzt werden kann. Dazu wurden Rohextrakte aus Ssp2-13myc produzierenden

Stämmen gewonnen und diese zur Immunpräzipitation eingesetzt. Mittels eines α -myc-spezifischen Antikörpers konnte ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 100 kDa immunpräzipitiert und in der „Westernblot“-Analyse nachgewiesen werden (Abb. 3.9 A). Da diese Proteinbande in der *ssp2 Δ* -Mutante als auch im Wildtyp nicht detektiert werden konnte (Abb. 3.9 B, Daten nicht gezeigt), wurde sie dem Ssp2-13myc-Fusionsprotein zugeordnet. Interessanterweise weicht das apparente Molekulargewicht von dem theoretischen Molekulargewicht (~ 87 kDa) des Ssp2-13myc-Proteins ab. Dies kann zum Beispiel auf posttranslationale Modifikationen wie beispielsweise Phosphorylierungen des Ssp2-Proteins zurückzuführen sein. Der α -Phospho-AMPK (T172)-spezifische Antikörper detektierte dieselbe Bande wie der α -myc-Antikörper bei demselben apparenten Molekulargewicht (α -Phospho, Abb. 3.9 A). Zudem war in der *ssp2 Δ* -Mutante keine spezifische Bande des Ssp2-Proteins nachweisbar (Abb. 3.9 B). Um auszuschließen, dass bei der Immunpräzipitation ein Protein der gleichen Größe wie Ssp2 präzipitiert wird und mit dem α -Phospho-AMPK (T172)-Antikörper unspezifisch kreuzreagiert, wurde auch ein Ssp2-3HA-Fusionsprotein mittels Immunpräzipitation untersucht. Auch hier konnte das durch den α -HA-Antikörper präzipitierte Protein mit dem α -Phospho-AMPK (T172)-Antikörper nachgewiesen werden. Die detektierten Proteinbanden zeigten hier ein apparentes Molekulargewicht von ~ 70 kDa in der „Westernblot“-Analyse (Abb. 3.9 A). Eine anschließende λ -Phosphatase-Behandlung des immunpräzipitierten Ssp2-13myc diente dem weiteren Nachweis des phosphorylierten Zustandes des Proteins. Eine λ -Phosphatase-Behandlung führte zum vollständigen Verschwinden der durch α -Phospho-AMPK (T172)-Antikörper detektierten Ssp2-Proteinbande (Abb. 3.9 C). Dahingegen konnte nach λ -Phosphatase-Behandlung Ssp2-13myc in der Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren mit dem α -Phospho-AMPK (T172)-Antikörper weiterhin detektiert werden. In Säugern führt Energielimitation zu einer Bindung von AMP an die β -Untereinheit, wodurch eine Dephosphorylierung des T172 innerhalb der α -Untereinheit verhindert wird (Hawley *et al.*, 1996). Durch eine Substitution des T189 zu dem nicht-phosphorylierbaren Alanin war es nicht länger möglich, das Ssp2-Protein mit dem α -Phospho-AMPK (T172)-Antikörper zu detektieren (Abb. 3.9 C). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der α -Phospho-AMPK (T172)-Antikörper spezifisch am T189 phosphoryliertes Ssp2 erkennt.

In Säugern stellt die Phosphorylierung am T172 ein absolut notwendiges Ereignis für die Aktivierung der AMPK α dar (Hawley *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Substitution des T189 zu Alanin auf die Funktionalität des Ssp2^{T189A} mittels einer Wachstumsanalyse näher untersucht. In dieser war zu beobachten, dass der Ssp2^{T189A}-13myc produzierende Stamm den gleichen Phänotyp wie eine *ssp2 Δ* -Mutante aufweist (Abb. 3.9 D). Dies zeigt, dass T189 in Ssp2 von *S. pombe* essentiell für die Funktion von Ssp2 ist.

Da ebenfalls T172 in Ppk9 von *S. pombe* konserviert ist, sollte auch hier die Möglichkeit überprüft werden, ob der α -Phospho-AMPK (T172) - Antikörper zur Analyse der Phosphorylierung des Ppk9 - Proteins eingesetzt werden kann. Dazu wurden Rohextrakte aus Ppk9-3HA produzierenden Stämmen gewonnen und diese zur Immunpräzipitation eingesetzt. Als Negativkontrolle diente der Wildtypstamm, welcher dieses Fusionsprotein nicht produziert. Mittels eines α -HA-spezifischen Antikörpers wurde ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~ 65 kDa nachgewiesen (Abb. 3.9 E). Da diese Proteinbande im Wildtypstamm nicht detektiert werden konnte, wurde sie dem Ppk9-3HA - Fusionsprotein zugeordnet. Des Weiteren detektiert der α -Phospho-AMPK (T172) - Antikörper dieselbe Bande wie der α -HA - Antikörper bei demselben apparenten Molekulargewicht. Da auch diese Bande nicht im Wildtyp detektiert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der α -Phospho-AMPK (T172) - Antikörper spezifisch Ppk9 erkennt. Um zu überprüfen, ob der α -Phospho-AMPK (T172) - Antikörper spezifisch die Phosphorylierungsstelle T178 des Ppk9 - Proteins erkennt, müsste noch eine Substitution des T178 zu Alanin erfolgen. Dieses Ppk9^{T178A} - Protein sollte dann von dem α -Phospho-AMPK (T172) - Antikörper nicht mehr erkannt werden. Um den Einfluss dieses Aminosäureaustausches auf die Funktion des Ppk9 - Proteins zu untersuchen, wären dann noch Wachstumsanalysen nötig. Da aber zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch keine Wachstumsdefekte für die *ppk9* Δ - Mutante beschrieben worden waren, die zum Vergleich gedient hätten, wurde auf die Substitution des T189 zu Alanin verzichtet.

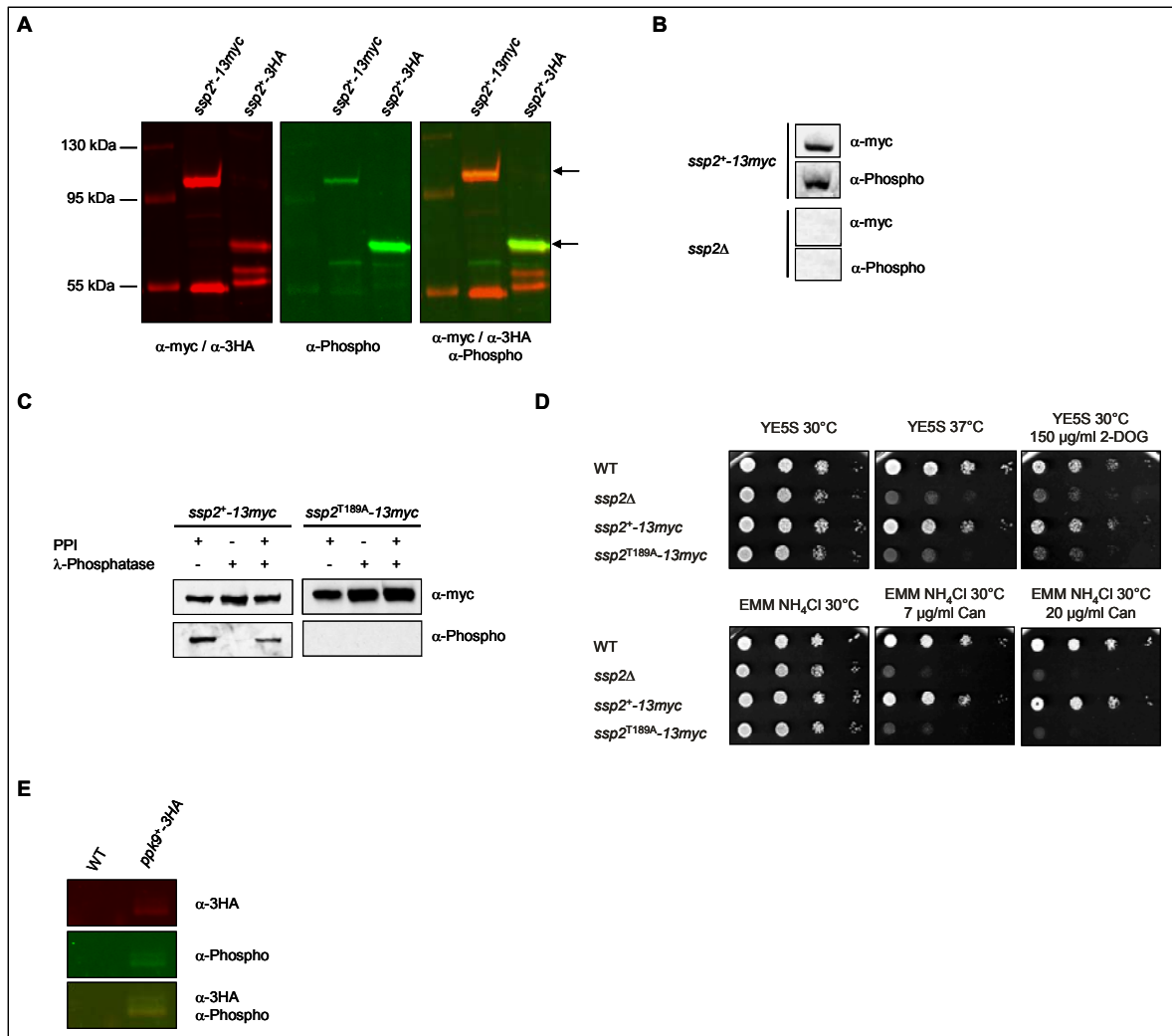


Abbildung 3.9: Nachweis und Bedeutung der Phosphorylierung am $Ssp2^{T189}$ und am $Ppk9^{T178}$. A + B: Zum immunologischen Nachweis des phosphorylierten T189 wurden Rohextrakte der *S. pombe*-Stämme $ssp2^+-13myc$ (SPKS19-1A), $ssp2^+-3HA$ (SPKS15-2A) und $ssp2\Delta$ (SPKS33-4B) (Negativkontrolle) in Lysispuffer mit Inhibitoren hergestellt. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 6 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem anti-myc- bzw. dem anti-3HA-Primärantikörper und anschließend mit ProtG-Sepharose. C: In An- und Abwesenheit von Phosphataseinhibitoren (PPI) wurden Rohextrakte der *S. pombe*-Stämme $ssp2^+-13myc$ (SPKS19-1A) und $ssp2^{T189A}-13myc$ (SPKS46-4) hergestellt. Nach der Immunpräzipitation einer Gesamtproteinmenge von 6 mg wurden die Proben mit λ -Phosphatase behandelt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem anti-myc-Primärantikörper. Das Immunpräzipitat aller Proben (A - C) wurde für 5 min bei 96 °C in SDS-Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion von Ssp2 erfolgte mit dem spezifischen Primärantikörper, die Detektion des phosphorylierten T189 mit dem α -Phospho-AMPK-Primärantikörper (α -Phospho). Das erwartete Molekulargewicht von Ssp2-13myc entspricht ~87 kDa und das von Ssp2-3HA ~70 kDa. D: Zur Überprüfung der Funktionalität der T189A-Substitution des Ssp2-Proteins wurden die *S. pombe*-Stämme WT (972), $ssp2\Delta$ (SPKS33-4B), $ssp2^+-13myc$ (SPKS19-1A) und $ssp2^{T189A}-13myc$ (SPKS46-4) verwendet. Die Inkubation der verschiedenen Nährböden erfolgte für 2-5 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C. E: Zum immunologischen Nachweis des phosphorylierten T189 wurden Rohextrakte der *S. pombe*-Stämme WT (972) und $ppk9^+-3HA$ (SPKS78-4C) in Lysispuffer mit Inhibitoren hergestellt. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 6 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem anti-HA-Primärantikörper. Das Immunpräzipitat wurde für 5 min bei 96 °C in SDS-Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion von Ppk9 erfolgte mit dem spezifischen Primärantikörper. Das erwartete Molekulargewicht von Ppk9-3HA entspricht ~65 kDa.

3.2.4.2. Phosphorylierung von Ssp2^{T189} und Ppk9^{T178} unter verschiedenen Stressbedingungen

Die Fähigkeit mittels des spezifischen α -Phospho-AMPK (T172) - Antikörpers das am T189 phosphorylierte Ssp2 - Protein oder Ppk9 - Protein in *S. pombe* nachzuweisen, eröffnet die Möglichkeit neue Signale, die zu einer erhöhten Phosphorylierung des Ssp2 und Ppk9 führen, zu identifizieren.

In Säugerzellen und *Drosophila* führt die Zugabe von 2-DOG zu einer zunehmenden Phosphorylierung der AMPK α am T172, was wiederum in einer Aktivierung der AMPK α resultiert (Jiang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Inoki *et al.*, 2003a, Pan and Hardie, 2002). Deshalb wurde in einem ersten Ansatz die Änderung der T189 - Phosphorylierung des Ssp2 - Proteins durch die Zugabe von 2-DOG (150 μ g/ml) in YE5S - Medium nach 30 und 60 min untersucht. Die Inkubation der Zellen mit 2-DOG führte jedoch zu einer massiven Lyse der Zellen, so dass eine Interpretation der erzielten Ergebnisse nicht möglich war (Anhang, Abb. 8.2; Daten nicht gezeigt). Ein Umsetzen der *S. pombe* - Zellkultur in glukosefreies YE - Medium führt zu einem eintretenden Kohlenstoffhunger und damit verbunden zu einer Energielimitation. Dadurch war es möglich, eine Änderung der T189 - Phosphorylierung, ausgelöst durch Kohlenstoffhunger bzw. Energielimitation zu untersuchen. Dabei wurden gleiche Mengen an Protein nach 30, 60 und 120 min Wachstum in glukosefreiem bzw. glukosehaltigem YE - Medium immunpräzipitiert. Bei gleichbleibender Ssp2-13myc - Expression trat nach 30 min eine erhöhte Phosphorylierung des T189 - Restes ein (Abb. 3.10 A). Interessanterweise führte ebenfalls die Zunahme der optischen Intensität ($OD_{600} \sim 0,8$) zu einer erhöhten T189 - Phosphorylierung (Abb. 3.10 B). Da die Glukosekonzentration im YE - Medium in Abhängigkeit von der optischen Dichte nicht abnahm (Daten nicht gezeigt), kann ein Effekt einer Glukoselimitation auf die eintretende Phosphorylierung am T189 ausgeschlossen werden. Dies suggeriert, dass die Abnahme anderer Nährstoffe im Medium wie beispielsweise Stickstoff eine Phosphorylierung von Ssp2 induziert. Deshalb wurde der Ssp2-13myc produzierende Stamm in EMM NH₄Cl - Medium angezogen und die logarithmisch wachsende Zellkultur in stickstoffreies EMM - Medium umgesetzt. Stickstofflimitation führt zu einer gering erhöhten T189 - Phosphorylierung (Abb. 3.10 C). Dies legt die Vermutung nahe, dass ein Mangel von mindestens einem weiteren unbekanntem Nährstoff die T189 - Phosphorylierung bei zunehmender optischer Dichte induziert.

Um erste Rückschlüsse auf die Funktion des Ppk9 - Proteins zu gewinnen, wurde die Änderung der Phosphorylierung des Ppk9 - Proteins in Abhängigkeit von der optischen Dichte untersucht. Dabei wurden gleiche Mengen an Protein in den verschiedenen Wachstumsphasen der Zellkultur immunpräzipitiert. Bei gleichbleibender Ppk9-3HA - Expression konnte während der logarithmischen und der stationären Wachstumsphase keine erhöhte Phosphorylierung des Ppk9 - Proteins verzeichnet werden (Abb. 3.10 D).

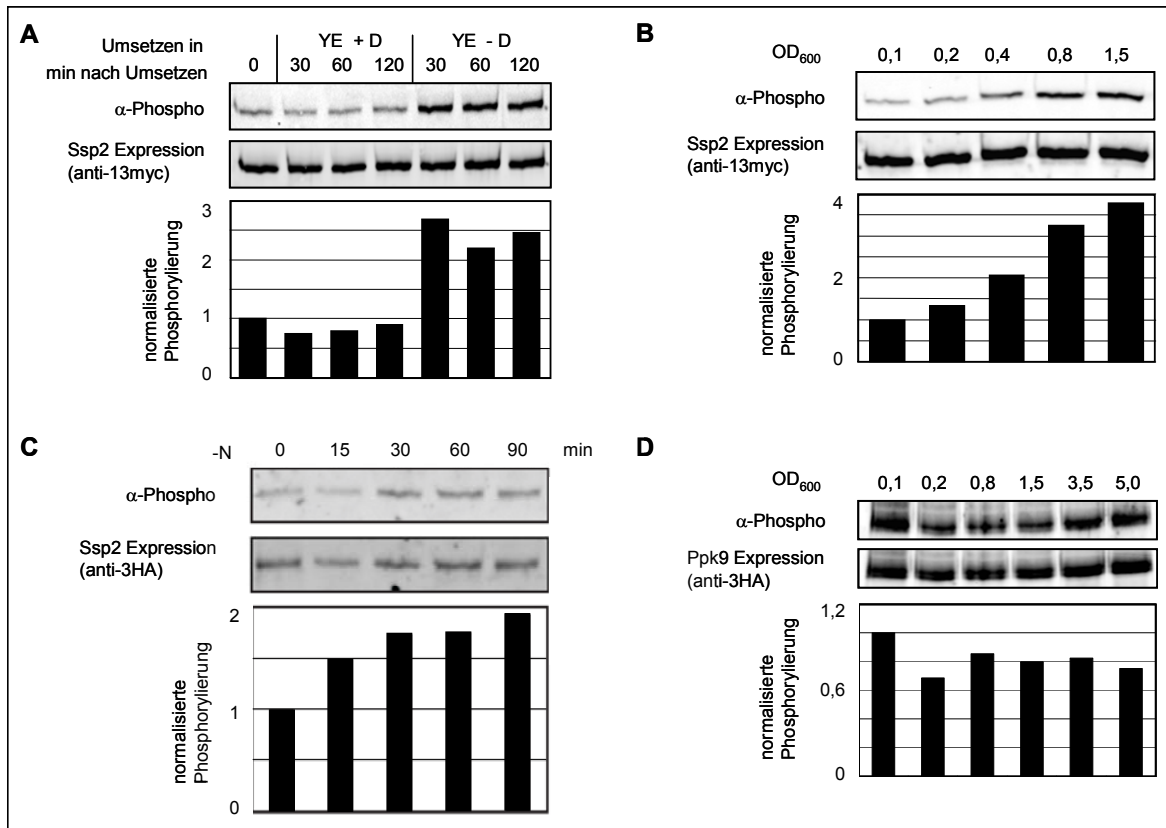


Abbildung 3.10: Phosphorylierung von Ssp2^{T189} und Ppk9^{T178} unter verschiedenen Stressbedingungen
A: Änderung der Phosphorylierung nach Glukosehunger. Der *S. pombe* - Stamm *ssp2⁻-13myc* (SPKS19-1A) wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5 in YE - Medium angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen (t0). Des Weiteren wurde die Zellkultur für 30, 60 und 120 min in YE - Medium (YE + D) und in YE - Medium ohne Glukose (YE - D) umgesetzt und die Rohextrakte gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 500 μ g für die Immunpräzipitation eingesetzt. **B:** Änderung der Phosphorylierung während des Zellwachstums. Zu der in der Abbildung angegebenen OD₆₀₀ wurden Rohextrakte des *S. pombe* - Stammes *ssp2⁺-13myc* (SPKS19-1A) gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. **C:** Änderung der Phosphorylierung nach Stickstoffhunger. Der *S. pombe* - Stamm *ssp2⁺-3HA* (SPKS15-2C) wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5 in EMM NH₄Cl - Medium angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen (t0). Des Weiteren wurde die Zellkultur für 15, 30, 60 und 90 min in EMM NH₄Cl - Medium (EMM +N) und in EMM - Medium ohne Stickstoff (EMM -N) umgesetzt und die Rohextrakte gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. **D:** Änderung der Phosphorylierung während des Zellwachstums. Zu der in der Abbildung angegebenen OD₆₀₀ wurden Rohextrakte des *S. pombe* - Stammes *ppk9⁺-3HA* (SPKS78-4C) gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem spezifischen Primärantikörper und anschließend mit ProtG - Sepharose. Das Immunpräzipitat wurde bei 96 °C für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion des Ssp2 - Proteins wurde mit dem anti-myc - Primärantikörper durchgeführt, die Detektion des Ppk9 - Proteins mit dem anti-HA - Primärantikörper und die des phosphorylierten T189 - Restes bzw. T178 - Restes mit dem α -Phospho-AMPK - Primärantikörper (α -Phospho). Das erwartete Molekulargewicht von Ssp2-13myc entspricht ~87 kDa, das von Ssp2-3HA ~70 kDa und das von Ppk9-3HA ~65kDa.

3.2.4.3. Einfluss des SpTORC1 auf die Phosphorylierung von Ssp2^{T189}

In allen eukaryotischen Spezies konnte eine Konservierung des TORC1, der das Zellwachstum je nach Nährstoffangebot reguliert, beschrieben werden. Energielimitierende Bedingungen resultieren in einer Aktivierung der AMPK α . In Folge dessen phosphoryliert die AMPK α Raptor, eine Komponente des mTORC1, was in einer Inaktivierung des mTORC1 resultiert (Gwinn *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu wird in der Hefe Snf1/AMPK durch den ScTORC1 negativ reguliert. Die Zugabe von Rapamycin resultiert in einer stark erhöhten Phosphorylierung des T210 von Snf1, wohingegen Zellen, welche ein Rapamycin - resistentes *TOR1* - Allel exprimieren, keine erhöhte Phosphorylierung des T210 aufweisen (Orlova *et al.*, 2006). Aufgrund dieser gegensätzlichen Regulationsmöglichkeiten des Zellwachstums ist es interessant zu klären, ob eine Inaktivierung von SpTORC1 in *S. pombe* eine Phosphorylierung des Ssp2 - Proteins am T189 induziert. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Rapamycin auf die Phosphorylierung von Ssp2^{T189} in *S. pombe* untersucht. Eine logarithmisch wachsende Zellkultur, welche das Ssp2-3HA - Fusionsprotein exprimiert, wurde in YE - Medium mit 200 ng/ml Rapamycin zum Zeitpunkt 0 umgesetzt. Zu definierten Zeitpunkten wurden Rohextrakte zur Immunpräzipitation des Ssp2-3HA - Proteins gewonnen und die Phosphorylierung von Ssp2^{T189} mittels „Westernblot“ - Analyse untersucht. Dabei konnte keine Änderung der Phosphorylierung von Ssp2^{T189} nach Zugabe von Rapamycin verzeichnet werden (Abb. 3.11).

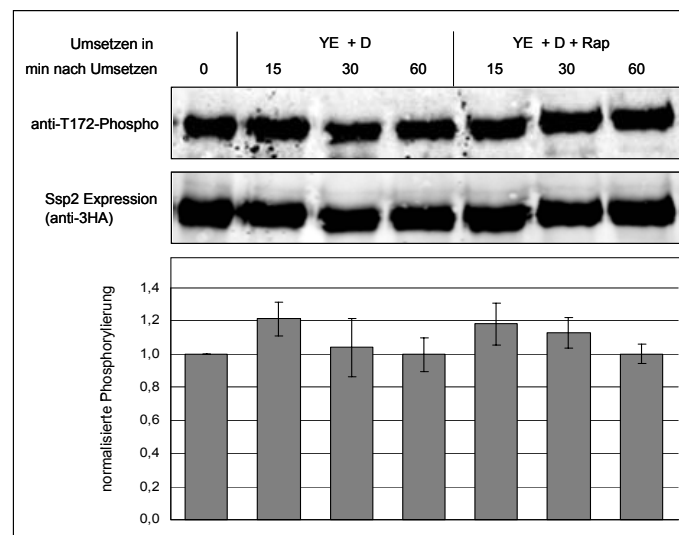


Abbildung 3.11: Einfluss von Rapamycin auf die Phosphorylierung von Ssp2^{T189}. Der *S. pombe* - Stamm *ssp2⁺-3HA* (SPKS15-2C) wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5 in YE - Medium angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen (t₀). Des Weiteren wurde die Zellkultur für 15, 30 und 60 min in YE - Medium (YE + D) und in YE - Medium mit 200 ng/ml Rapamycin (YE + D + Rap) umgesetzt und die Rohextrakte gewonnen. Es wurde eine Gesamtproteinmenge von 2 mg für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte mit dem spezifischen Primäntikörper und anschließend mit ProtG - Sepharose. Das Immunpräzipitat wurde bei 96 °C für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert und anschließend in einem 7,5 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion des Ssp2 - Proteins erfolgte mittels des anti-HA - Primäntikörpers und die Detektion des phosphorylierten T189 - Restes erfolgte mittels des α -Phospho-AMPK - Primäntikörpers (α -T172-Phospho). Das erwartete Molekulargewicht von Ssp2-3HA entspricht ~70 kDa. Die Abbildung zeigt das arithmetische Mittel der normalisierten Phosphorylierung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Standardabweichungen sind im Diagramm als Balken gekennzeichnet.

3.2.5. Phänotypische Auswirkungen einer Deletion der Untereinheiten der AMPK in *S. pombe*

Um weitere Einblicke in die Funktion der AMPK - Komplexe zu erhalten, wurden die für die Untereinheiten kodierenden Gene deletiert. Da die mittels PCR - überprüfte Deletionsstämme Zellwachstum aufwiesen, scheinen die Gene *ssp2⁺*, *ppk9⁺*, *SPCC1919.03c⁺* und *cbs2⁺* nicht essentiell für *S. pombe* zu sein. Das *ssp2⁺* und *ppk9⁺* nicht essentiell sind, konnte auch in einer systematischen Deletion aller Gene, welche für potentielle Proteinkinasen in *S. pombe* kodieren, gezeigt werden (Bimbó *et al.*, 2005). Auch die gleichzeitige Deletion von *ppk9⁺* und *ssp2⁺* führt zu keiner Letalität dieser Doppelmutante (Abb. 3.12, YE5S 30°C). Dadurch war es möglich, die erhaltenen Mutanten auf ihr Wachstum unter verschiedenen Stress - und Hungerbedingungen zu testen.

Wie in Abb. 3.12 zu sehen, führt die Deletion des *ssp2⁺* - Gens in Vollmedium (YE5S) zu einer Sensitivität gegenüber erhöhter Temperatur (37 °C) sowie in der Anwesenheit von 150 µg / ml 2-DOG. Die Zugabe der osmotisch stabilisierenden Substanz Sorbitol (1 M) zu den angegebenen Medien führt zu einer Suppression der zuvor beschriebenen Wachstumsdefekte.

Des Weiteren wurde das Wachstum in Anwesenheit des toxischen Aminosäureanalogons der Aminosäure Arginin (Canavanin) getestet. Es ist bekannt, dass *tsc1⁺* - und *tsc2⁺* - Deletionsmutanten eine Resistenz gegenüber Canavanin aufweisen (van Slegtenhorst *et al.*, 2004; A. Dierkes, persönliche Mitteilung). Im Vergleich zum Wildtyp weist eine *ssp2Δ* - Mutante eine Hypersensitivität in der Anwesenheit von 20 µg/ml Canavanin auf (Abb. 3.12). Erfolgt ein Austausch der Kohlenstoffquelle Glukose in den Nährböden gegen 3 % Glycerin und 3 % Ethanol, 2 % Galaktose oder 2 % Raffinose, so kann der Wildtyp diese als Kohlenstoffquelle minimal verwerten. In der Abwesenheit von Glukose konnte kein Zellwachstum mehr verzeichnet werden. Aufgrund dessen kann ein durch die Zellanzucht in Vollmedium (YE5S) begründetes Restwachstum der *S. pombe* - Stämme ausgeschlossen werden. Dahingegen war die *ssp2Δ* - Mutante nicht mehr in der Lage, in der Anwesenheit nicht - fermentierbarer Kohlenstoffquellen wie Glycerin / Ethanol, Galaktose und Raffinose zu wachsen.

Wird der Nährboden mit dem Schwermetall Cadmium (CdAc) versetzt, so weist die *ssp2Δ* - Mutante eine Resistenz gegenüber dem Wildtyp auf.

Zusätzlich scheint Ssp2 eine Rolle bei der Adaption an osmotischen Stress zu spielen. Eine *ssp2Δ* - Mutante weist eine Resistenz auf Nährböden mit NaCl gegenüber dem Wildtyp auf, wohingegen die Deletion des *ssp2⁺* - Gens auf Nährböden mit KCl zu einem Wachstumsdefekt führt.

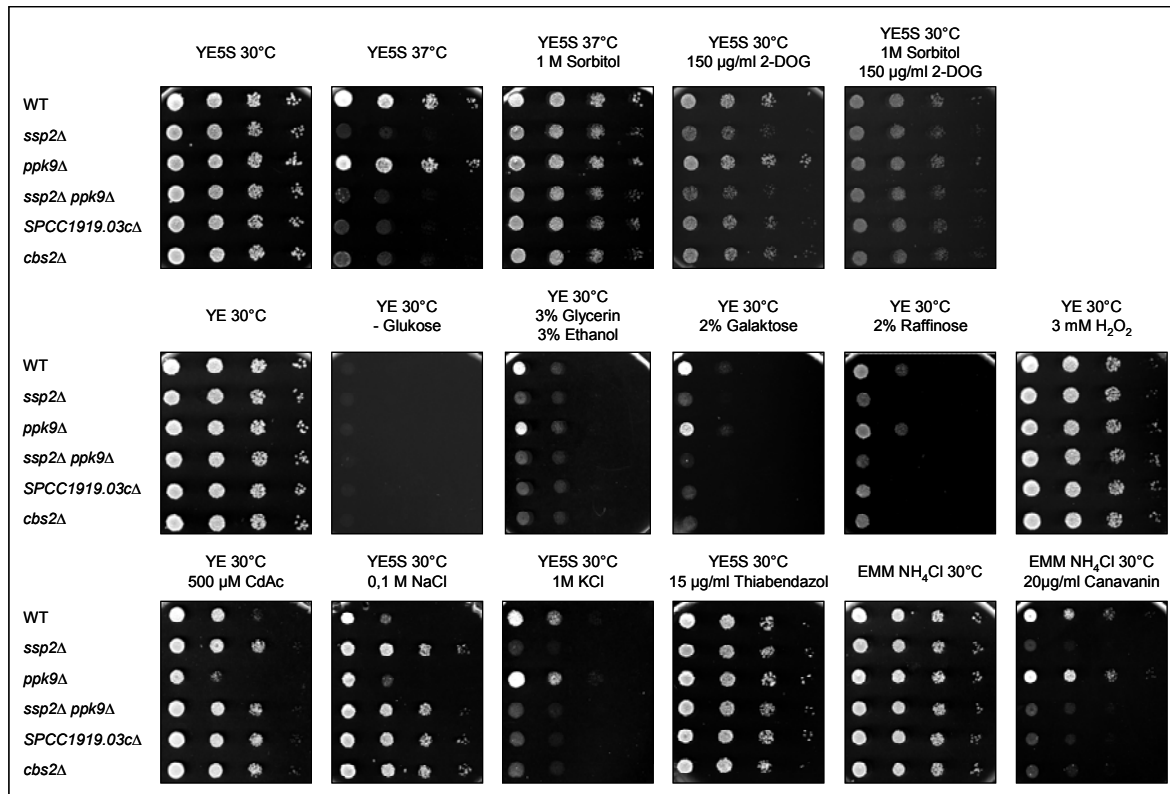


Abbildung 3.12: Wachstumsanalyse der *ssp2Δ* -, *ppk9Δ* -, *cbs2Δ* - und *SPCC1919.03cΔ* - Einzelmutanten sowie der *ssp2Δ ppk9Δ* - Doppelmutante. Es wurden die *S. pombe* - Stämme WT (972), *ssp2Δ* (SPKS33-4B), *ppk9Δ* (SPKS98-2C), *cbs2Δ* (SPKB5-2), *SPCC1919.03cΔ* (SPKB3-1) und *ssp2Δ ppk9Δ* (SPKS101-6A) verwendet. Die Inkubation der Stämme auf den verschiedenen Nährböden erfolgte für 2 - 5 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C.

Zur näheren Charakterisierung der Ppk9 - Funktion wurde ebenfalls die *ppk9Δ* - Mutante auf ihr Wachstum unter verschiedenen Stress - und Hungerbedingungen getestet. Im Gegensatz zu einer Deletion des *ssp2⁺* - Gens resultiert die Deletion des *ppk9⁺* - Gens in einem sehr schwachen resistenten Wachstumsverhalten gegenüber Canavanin. In der Anwesenheit von nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen kann die *ppk9Δ* - Mutante wie der Wildtyp diese als Kohlenstoffquelle minimal verwerten. Des Weiteren resultiert die Deletion von *ppk9⁺* nicht in einer Hypersensitivität gegenüber 2-DOG. Die *ppk9Δ* - Mutante weist das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp auf. Dies konnte auch in Anwesenheit von NaCl oder KCl beobachtet werden.

Da in Säugern eine Aktivierung der AMPK α_2 als Reaktion auf oxidativen Stress nachgewiesen werden konnte (Qin and de Vries, 2008), wurde des Weiteren der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf das Zellwachstum der *ppk9Δ* - Mutante untersucht. Es konnte jedoch keine Involvierung von Ppk9 in die Adaption an oxidativen Stress beobachtet werden. Eine Inkubation der *ppk9Δ* - Mutante auf Nährböden mit 3 mM H₂O₂ resultiert in dem gleichen Wachstumsverhalten wie der Wildtyp (Abb. 3.12). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des *ppk9⁺* - Gens zu einem leicht verminderten Zellwachstum in Anwesenheit von Thiabendazol führt (Bimbó et al., 2005). Dies konnte in den hier durchgeführten Wachstumsanalysen nicht bestätigt werden (Abb. 3.12).

Im Zuge dieser Wachstumsanalyse wurde ebenfalls der Verlust der Funktion der potentiellen β - oder γ - Untereinheit näher charakterisiert. Auch hier ist zu beobachten, dass eine Deletion des *cbs2⁺* - oder des *SPCC1919.03c⁺* - Gens zu einer Sensitivität gegenüber erhöhter Temperatur (37 °C), gegenüber 2-DOG, Canavanin und KCl. Jedoch ist die Sensitivität gegenüber 2-DOG nicht so stark ausgeprägt wie in einer *ssp2 Δ* - Mutante. Des Weiteren konnte, wie bei einer *ssp2 Δ* - Mutante, eine Resistenz gegenüber NaCl und Cadmium (CdAc) beobachtet werden. In der Verwertung nicht - fermentierbarer Kohlenstoffquellen verhält sich die *cbs2 Δ* - und die *SPCC1919.03c Δ* - Mutante wie eine *ssp2⁺* - Deletionsmutante.

Um zu überprüfen, ob Ssp2 und Ppk9 gleiche oder getrennte Funktionen in der Zelle ausüben, wurde in einem nächsten Ansatz die Auswirkung einer gleichzeitigen Deletion des *ppk9⁺* - und des *ssp2⁺* - Gens untersucht. Dabei fiel auf, dass unter all den getesteten Wachstumsbedingungen der Phänotyp einer *ssp2 Δ* - Mutante dominierte. Gleich dieser resultierte die gleichzeitige Deletion von *ssp2⁺* und *ppk9⁺* in einer Sensitivität gegenüber 2-DOG, Canavanin und KCl und in einer Resistenz gegenüber NaCl und Cadmium. Ebenso war die Doppelmutante nicht mehr in der Lage auf nicht - fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glycerin / Ethanol, Galaktose und Raffinose zu wachsen (Abb. 3.12). Aufgrund dieser Beobachtungen, scheinen Ssp2 und Ppk9 getrennte zelluläre Funktionen auszuüben.

Die Beobachtung, dass sich eine *ssp2 Δ* - Mutante sensitiv gegenüber 2-DOG verhält, diese Sensitivität aber durch den osmotischen Stabilisator Sorbitol aufgehoben werden kann, deutet auf einen aus der Deletion des *ssp2⁺* - Gens resultierenden Zellwanddefekt hin. Zur Aufrechterhaltung der Morphologie und der strukturellen Integrität von Hefezellwänden sind verschiedene Polysaccharide (Chitin; 1,3- β -Glucan) nötig. Die durch 2-DOG induzierte Zellwandlyse wird durch die Inhibierung einiger Reaktionen zur Bildung der Vorstufen für Zellwandpolysaccharide ausgelöst (Megnet, 1965). Zusätzlich führt eine Deletion des *ssp2⁺* - Gens zu einer durch Sorbitol supprimierbaren Temperatursensitivität. Diese Phänotypen wurden auch für Mutanten beschrieben, die einen Zellwanddefekt aufweisen (Madrid *et al.*, 2006; Arellano *et al.*, 1999). Die Fähigkeit von Sorbitol, die hier beschriebenen Wachstumsdefekte zu supprimieren, ist jedoch kein zwingendes Indiz für einen Effekt der Deletion des *ssp2⁺* - Gens auf die Zellwand. Sorbitol selbst löst in der Zelle einen osmotischen Stress über den Sty1 / Spc1 - Signalweg aus (Madrid *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2002). Möglicherweise führt eine Aktivierung des Sty1 / Spc1 - Signalweges zu einer Kompensation der durch die Deletion des *ssp2⁺* - Gens hervorgerufenen Wachstumsdefekte bei 37°C und gegenüber 2-DOG.

Um zu verifizieren, ob die Deletion des *ssp2⁺* - Gens zu einem Zellwanddefekt führt, wurden die Zellen des Wildtyps und der *ssp2 Δ* - Mutante mit Zymolyase behandelt, welche zur Lyse der Zellwand von lebenden Hefezellen führt. Mutanten, die einen Defekt in der Zellwandintegrität aufweisen, zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sensitivität gegenüber Zymolyase. Dies

konnte für die *ssp2Δ* - Mutante nicht gezeigt werden (Abb. 3.13). Während der Behandlung mit Zymolyase konnte im Vergleich zum Wildtyp kein signifikanter Unterschied in der Änderung der OD_{600} , welche als Maß der Zellwandlyse verwendet wurde, beobachtet werden. Somit führt eine Deletion des *ssp2⁺* - Gens zu keinem Zellwanddefekt. Diese Schlussfolgerung konnte auch mittels eines Lysetests bestätigt werden (persönliche Mitteilung, A. Lorberg).

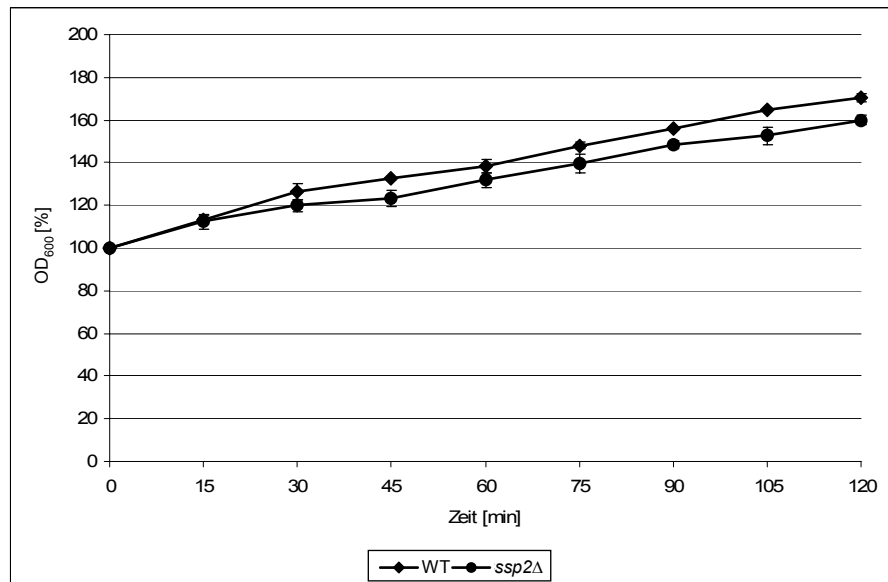


Abbildung 3.13: Überprüfung eines Zellwanddefektes in der *ssp2Δ* - Mutante. Die *S. pombe* - Stämme WT (972) und *ssp2Δ* (SPKS23-3B) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ in YE - Medium angezogen. 10×10^6 Zellen wurden in TE - Puffer gewaschen und anschließend in 300 $\mu\text{g/ml}$ Zymolyase-20T bei RT inkubiert. Die Änderung der OD_{600} in Abhängigkeit der Zeit wurde als Maß der Zellwandlyse verwendet. Die Abbildung zeigt das arithmetische Mittel aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Standardabweichungen sind im Diagramm als Balken gekennzeichnet.

3.2.6. Komplementationsanalyse von *S. cerevisiae* - und *S. pombe* - Stämmen mit fehlender AMPK α - Untereinheit

3.2.6.1. Komplementation einer *snf1Δ* - Mutante durch die Expression des *ssp2⁺* - Gens

Im Falle der AMP - aktivierten Proteinkinase handelt es sich um eine hochkonservierte Kinase, welche durch verschiedene Stressstimuli aktiviert wird. Mittels genetischer Studien konnte ebenfalls ein Homologes der AMPK α in *S. cerevisiae* (Snf1) nachgewiesen werden (Carling *et al.*, 1994; Woods *et al.*, 1994; Mitchelhill *et al.*, 1994). Snf1 (sucrose - nonfermenting) ist zum einen bei der Adaption von *S. cerevisiae* - Zellen an eintretenden Energiemangel nötig. Zum anderen wird Snf1 für das Wachstum auf alternativen Kohlenstoffquellen benötigt. Bei Glukoselimitation (McCartney *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 1996) und anderen Stressbedingungen wie beispielsweise osmotischer Stress oder Stickstofflimitation (Hong and Carlson, 2007; Orlova *et al.*, 2006) wird die Snf1 - Proteinkinase durch Phosphorylierung am konservierten T210 aktiviert. Ähnlich wie in Säugern ist die Snf1/AMPK als Heterotrimer aktiv. Das Genom von *S. cerevisiae* kodiert für die katalytische α - Untereinheit Snf1, drei alternative β - Untereinheiten Sip1, Sip2 und Gal83 sowie für die γ - Untereinheit Snf4. Aufgrund dessen liegen

in der Hefe *S. cerevisiae* drei verschiedene Snf1/AMPK - Komplexe vor (Elbing *et al.*, 2006; Nath *et al.*, 2002).

Ein Sequenzvergleich zeigt eine Identität von Snf1 zu dem AMPK α_1 - Homolog Ssp2 in *S. pombe* von 43 % (Abb. 3. 4). Aufgrund dessen wurden Wachstumsanalysen auf Nährmedien durchgeführt, auf denen *snf1* Δ - Mutanten Wachstumsdefekte zeigen. Jedoch zeigten die durchgeführten Wachstumsanalysen, dass die Expression von *ssp2*⁺ das Snf1 - Protein in *S. cerevisiae* nicht ersetzen kann (Abb. 3.14). Da die Gensequenz von *ssp2*⁺ Introns und Exons enthält, ist es möglich, dass *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist, die prä-mRNA korrekt zu spleißen. In Folge liegt kein funktionelles Ssp2 vor.

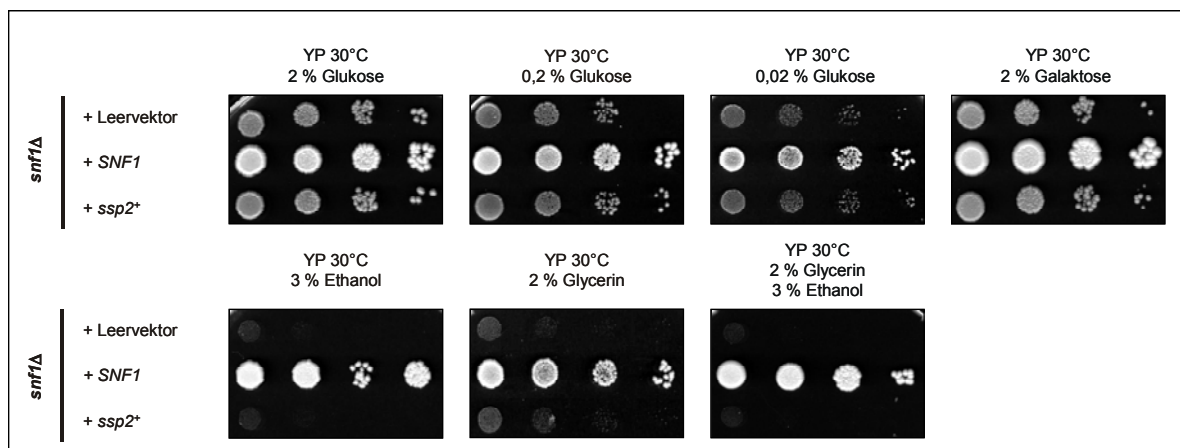


Abbildung 3.14: Komplementation einer *snf1* Δ - Mutante durch das *S. pombe* *ssp2*⁺ - Gen. In die *snf1* Δ - Mutante (AN4-3D) wurde der Leervektor (YCplac33, Negativkontrolle), ein Plasmid, welches das *SNF1* - Gen (pAN12 her, Positivkontrolle) oder das *ssp2*⁺ - Gen (pKS11-8.1 neu) enthält, transformiert. Die Inkubation der verschiedenen Nährböden erfolgte für 3 - 5 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C.

3.2.6.2. Komplementation einer *ssp2* Δ - Mutanten durch die Expression des *SNF1* - Gens

In einem nächsten Ansatz wurde untersucht, ob das *SNF1* - Gen die Phänotypen einer *ssp2* Δ - Mutante supprimieren kann. Die durch die Deletion des *ssp2*⁺ - Gens hervorgerufenen Wachstumsphänotypen können durch die Expression von *SNF1* aufgehoben werden. So wurde die erhöhte Temperatursensitivität der *ssp2* Δ - Mutante durch *SNF1* teilweise aufgehoben (Abb. 3.15). Zusätzlich ist eine vollständige Suppression der Sensitivität gegenüber 2-DOG, Canavanin und Ethionin zu verzeichnen.

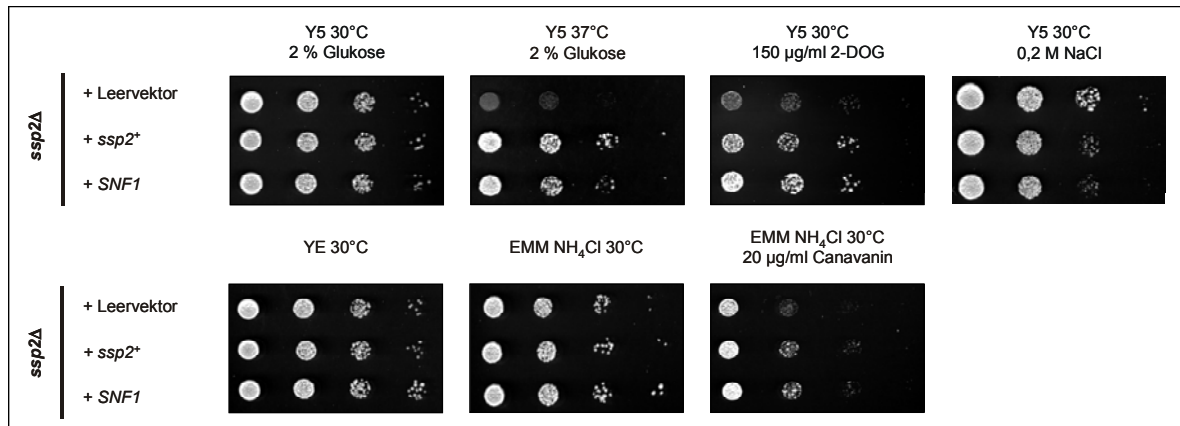


Abbildung 3.15: Komplementation einer *ssp2Δ* - Mutante durch das *S. cerevisiae* *SNF1* - Gen. In die *ssp2Δ* - Mutante (SPKS33-3C) wurde der Leervektor (pUR18, Negativkontrolle), ein Plasmid, welches das *ssp2⁺* - Gen (pKS33-2 her, Positivkontrolle) oder das *SNF1* - Gen (pKS53-1) enthält, transformiert. Die Inkubation der verschiedenen Nährböden erfolgte für 3 - 5 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C.

3.2.7. Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges auf das Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen in einer *ssp2Δ* - Mutante

Die *ssp2⁺* - Deletionsmutante verhält sich gegensätzlich zu den *tsc1⁺* - bzw. *tsc2⁺* - Deletionsmutanten (A. Dierkes, persönliche Mitteilung). Dies lässt antagonistische Funktionen der Tsc - Proteine und des Ssp2 - Proteins vermuten. Um eine mögliche Funktion von Ssp2 innerhalb des TOR - Signalweges näher zu untersuchen, erfolgte eine Epistasie - Analyse. Eine zusätzliche Deletion des *tsc1⁺* - und / oder des *tsc2⁺* - Gens in der *ssp2Δ* - Mutante führt zu einer Suppression des Wachstumsdefektes in Anwesenheit von 2-DOG, Canavanin und D,-L-Ethionin (Abb. 3.16 A). Dies führt zu der Annahme, dass eine Hyperaktivierung des TSC - Signalweges zu einer Suppression dieser spezifischen Wachstumsdefekte in der *ssp2Δ* - Mutante führt. Die für die *ssp2Δ* - Mutante beschriebene Temperatursensitivität konnte durch eine zusätzlich Deletion des *tsc1⁺* - oder des *tsc2⁺* - Gens teilweise aufgehoben werden (Abb. 3.16 A). Jedoch konnte dies für die *tsc1Δ tsc2Δ ssp2Δ* - Mutante nicht beobachtet werden. Wird im Medium Glukose gegen nicht - fermentierbare Kohlenstoffquellen ausgetauscht, so ist die *ssp2Δ* - Mutante nicht mehr in der Lage, diese zu verwerten (Abb. 3.12). Eine Hyperaktivierung des TSC - / Rhb1 - Signalweges konnte diesen Wachstumsdefekt nicht aufheben (Abb. 3.16 A). Dies konnte auch in Anwesenheit von NaCl im Medium beobachtet werden. Die durch die *ssp2⁺* - Deletion vermittelte Resistenz wurde durch die zusätzliche Deletion des *tsc1⁺* - und / oder des *tsc2⁺* - Gens nicht unterdrückt.

In einem weiteren Ansatz wurde der Effekt einer Überexpression von *rhb1⁺* auf die beschriebenen Wachstumsdefekte der *ssp2⁺* - Deletionsmutante untersucht (Abb. 3.16 B). Die Überexpression von *rhb1⁺* in der *ssp2Δ* - Mutante führte zu einer Suppression der Wachstumsdefekte in der Anwesenheit der toxischen Aminosäureanaloga Canavanin oder 5-Fluoro-Tryptophan. Wird das Medium mit 2-DOG versetzt, resultiert die Überexpression von *rhb1⁺* in der *ssp2Δ* - Mutante in einer verringerten Sensitivität gegenüber 2-DOG. Jedoch konnte keine Suppression der Wachstumsdefekte einer *ssp2Δ* - Mutante in der Anwesenheit von nicht - fermentierbarer

Kohlenstoffquellen und bei einer Wachstumstemperatur von 37 °C beobachtet werden. Dies konnte auch in Anwesenheit von NaCl im Medium beobachtet werden. Die durch die *ssp2⁺* - Deletion vermittelte Resistenz wurde durch die Überexpression von *rhl1⁺* in der *ssp2Δ* - Mutante nicht unterdrückt. Durch diese Beobachtungen wurde die Funktion von Ssp2 oberhalb der Tsc - Proteine oder in einem zu den Tsc's parallelen Signalweg sowohl unter Hitzestress als auch in der Anwesenheit von toxischen Aminosäureanaloga und 2-DOG postuliert. In der Anwesenheit nicht - fermentierbarer Kohlenstoffquellen und unter osmotischen Stress scheint Ssp2 in einem von den Tsc - Proteinen unabhängigen Signalweg zu agieren.

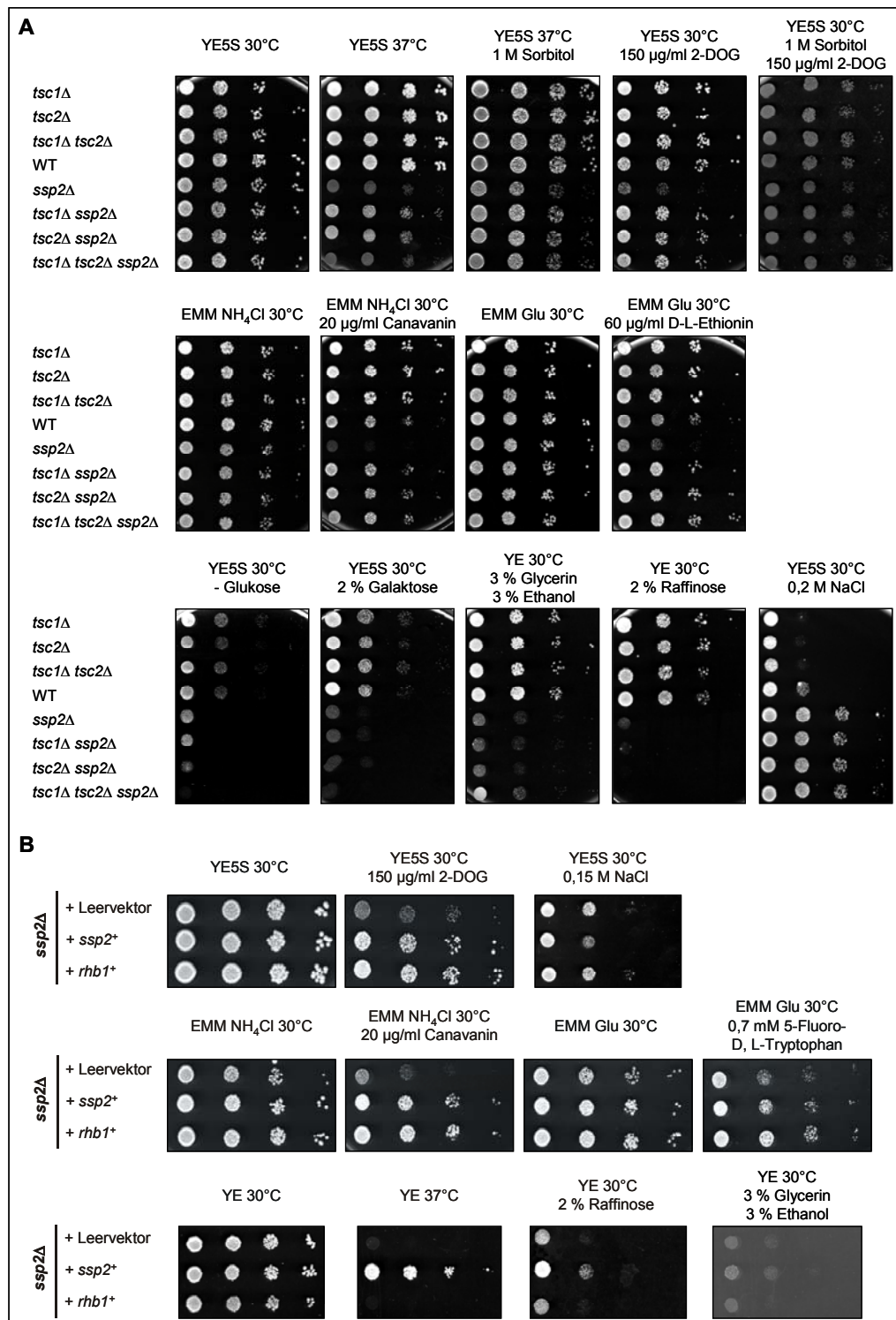


Abbildung 3.16: Effekt einer Hyperaktivierung des TOR-Signalweges in der *ssp2*⁺-Deletionsmutante. **A:** Es wurden die *S. pombe*-Stämme *tsc1Δ* (SpAD1-4), *tsc2Δ* (SPKS26-6A), *tsc1Δ tsc2Δ* (SPAD36-1B), WT (972), *ssp2Δ* (SPKS23-3B), *tsc1Δ ssp2Δ* (SPKS23-3A), *tsc2Δ ssp2Δ* (SPKS39-5D) und *tsc1Δ tsc2Δ ssp2Δ* (SPKS48-1) verwendet. **B:** In die *ssp2Δ*-Mutante (SPKS25-5C) wurde der Leervektor (pAD19), ein Plasmid, welches das *ssp2*⁺-Gen (pAD28) oder das *rhb1*⁺-Gen (pAD20) enthält, transformiert. Die Inkubation der Stämme auf den verschiedenen Nährböden erfolgte für 2 - 5 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C.

3.2.8. Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges auf die Argininaufnahme in einer *ssp2Δ* - Mutante

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine Hypersensitivität der *ssp2⁺* - Deletionsmutante gegenüber Canavanin beschrieben werden. Diese kann zum Beispiel durch eine verstärkte Aufnahme des toxischen Aminosäureanalogons verursacht werden. Diese Hypothese kann durch die Suppression des Wachstumsdefektes aufgrund einer Hyperaktivierung des TSC- / Rhb1 - Signalweges unterstützt werden. Die Deletion des *tsc1⁺* - und / oder des *tsc2⁺* - Gens führen zu Defekten in der Aufnahme von Aminosäuren (Matsumoto *et al.*, 2002; van Slegtenhorst *et al.*, 2004). Um einen Nachweis der erhöhten Aufnahme von Canavanin zu erbringen, erfolgte eine Messung der Argininaufnahme mittels radioaktiv markierten L-[³H]-Arginin. Jedoch weist das arithmetische Mittel aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen enorme Schwankungen in der Standardabweichung auf (Abb. 3.17). Im Vergleich zum Wildtyp weist die *ssp2Δ* - Mutante eine leicht verminderte Aufnahme der Aminosäure Arginin auf. Eine verringerte Argininaufnahme sollte jedoch zu einer Canavanin - Resistenz führen. Somit scheint die Hypersensitivität der *ssp2⁺* - Deletionsmutante gegenüber Canavanin (Abb. 3.12) nicht in einer erhöhten Argininaufnahme begründet zu liegen. Obwohl in den durchgeführten Wachstumsanalysen die zusätzliche Deletion des *tsc2⁺* - Gens in der *ssp2Δ* - Mutante in einer Suppression der Sensitivität gegenüber Canavanin resultiert (Abb. 3.16 A), konnte in der *tsc2Δ ssp2Δ* - Mutante keine Abnahme in der Argininaufnahme beobachtet werden (Abb. 3.17). Nach dieser Messung würde eine zusätzliche Deletion des *ssp2⁺* - Gens in der *tsc2Δ* - Mutante zu einer fünffach erhöhten Aufnahme der Aminosäure Arginin, gleich der einer *ssp2⁺* - Einzeldelation, führen. Im Gegensatz dazu weist die *tsc1Δ ssp2Δ* - Mutante eine verminderte Aufnahme von Arginin auf, welches die in den Wachstumsanalysen beobachtete verringerte Hypersensitivität einer *ssp2Δ* - Mutante gegenüber Canavanin bestätigen würde.

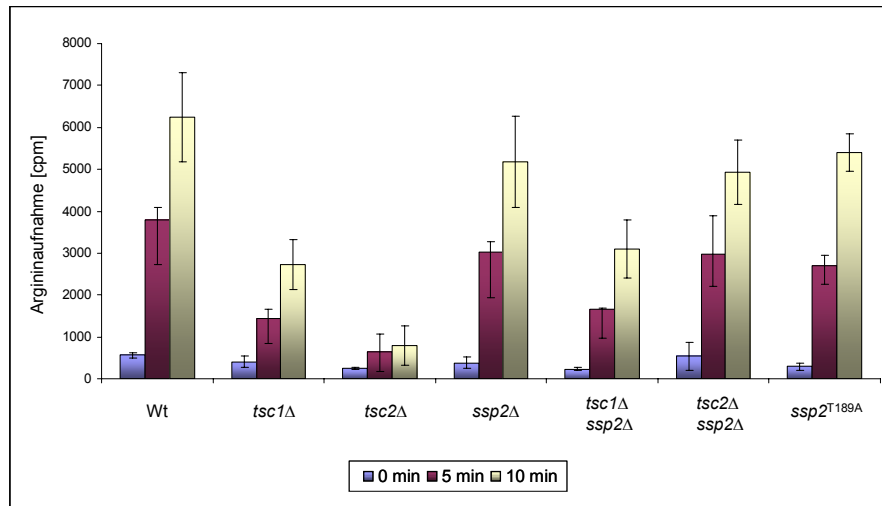


Abbildung 3.17: Messung der Argininaufnahme in den verschiedenen *ssp2* - Mutanten. Die *S. pombe* - Stämme WT (972), *tsc1Δ* (SpAD1-4), *tsc2Δ* (SPKS26-6A), *ssp2Δ* (SPKS23-3B), *tsc1Δ ssp2Δ* (SPKS23-3A), *tsc2Δ ssp2Δ* (SPKS39-5D) und *ssp2^{T189A}* wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ in EMM - Medium mit NH_4Cl angezogen. $2,5 \times 10^6$ Zellen wurden in EMM NH_4Cl - Medium aufgenommen und mit $1 \mu Ci$ L- $[^3H]$ -Arginin sowie $100 \mu M$ nicht - radioaktivem Arginin versetzt. Die Aufnahme von L- $[^3H]$ -Arginin wurde in einem „Scintillation counter“ gemessen. Die Abbildung zeigt das arithmetische Mittel aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Die Standardabweichungen sind im Diagramm als Balken gekennzeichnet.

3.2.9. Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges auf die sexuelle Differenzierung einer *ssp2Δ* - Mutante

S. pombe - Wildtypzellen mit entgegengesetztem Paarungstyp sind in der Lage zu paaren, wenn Stickstoff limitiert wird. Sie durchlaufen danach die Meiose. Im Zuge der Rückkreuzung der durch homologe Rekombination erhaltenen *ssp2Δ* - Transformanden mit dem Wildtyp fiel auf, dass die *ssp2Δ* - Mutante nicht mehr zur Paarung fähig war. Aufgrund dessen wurde eine Messung der Paarungseffizienz relativ zum Wildtyp durchgeführt. In dieser konnte deutlich gezeigt werden, dass eine Deletion des *ssp2⁺* - Gens zu einem Defekt in der Konjugation und zu einem Verlust der Sporulationsfähigkeit nach Stickstoffhunger führt (A. Lorberg, persönliche Mitteilung). Des Weiteren wiesen die *tsc⁺* - Mutanten, im Vergleich zu der *ssp2Δ* - Mutante, einen nicht so stark ausgeprägten Verlust der Konjugation und sexuellen Differenzierung auf (A. Lorberg, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde die Möglichkeit einer Komplementation des Paarungsdefektes in den verschiedenen *ssp2* - Mutanten untersucht. In einem ersten Ansatz wurden die verschiedenen *ssp2* - Mutanten entweder mit dem Leervektor oder mit einem Plasmid, welches entweder das *tsc1⁺* -, das *tsc2⁺* - oder das *ssp2⁺* - Gen exprimiert, transformiert. Diese Transformanden wurden in selektivem Minimalmedium angezogen und anschließend mit Wildtypzellen mit gegensätzlichem Paarungstyp gepaart. Mittels Jodfärbung, die eine sich in den Sporen akkumulierende amyloseähnliche Substanz anfärbt (Leupold, 1955), wurde die Anzahl der sich bildenden Sporen qualitativ bestimmt. Wie in Abb. 3.18 A zu sehen ist, konnte der Paarungsdefekt einer *ssp2Δ* - Mutante, in welche der Leervektor transformiert wurde, bestätigt werden. Die Transformation von Plasmiden, die das *tsc1⁺* - bzw. das *tsc2⁺* - Gen exprimieren,

fürte zu keiner Suppression des Paarungsdefektes. Obwohl im Zuge der Konstruktion der verschiedenen *ssp2⁺* - Mutanten durch die Transformation des *ssp2⁺* - exprimierenden Plasmides ein Wiederherstellen der Paarungseffizienz beobachtet werden konnte, konnte dies in der hier durchgeführten Analyse nicht verzeichnet werden (Abb. 3.18 A). Zwar wurden die Transformanden zur Bestimmung der Paarungseffizienz in selektivem Minimalmedium angezogen, jedoch besteht die Möglichkeit, dass das *ssp2⁺* - exprimierende Plasmid nicht stabil während der Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben wurde.

Im Gegensatz zu der *ssp2Δ* - Einzelmutante konnte sowohl in der *tsc1Δ ssp2Δ* -, in der *tsc2Δ ssp2Δ* - als auch in der *tsc1Δ tsc2Δ ssp2Δ* - Mutante eine deutliche Braunfärbung des Paarungsansatzes beobachtet werden (Abb. 3.18 A, + Leervektor). Somit scheint eine Hyperaktivierung des TSC -/ Rhb1 - Signalweges in der *ssp2Δ* - Mutante in einer Suppression des Paarungsdefektes zu resultieren. Des Weiteren führt die Transformation des *tsc1⁺* - Gens in die *tsc1Δ ssp2Δ* - Mutante als auch die Transformation des *tsc2⁺* - Gens in die *tsc2Δ ssp2Δ* - Mutante zu dem gleichen Paarungsverhalten wie eine *tscΔ ssp2Δ* - Mutante + Leervektor. Jedoch wäre ein Paarungsdefekt, entsprechend der *ssp2Δ* - Mutante zu erwarten gewesen. Aufgrund dessen wurde auch hier davon ausgegangen, dass die jeweiligen Plasmide in den Transformanden während der Zellteilung nicht auf die Tochterzellen weitergegeben wurden. Dies könnte auch die nicht erhöhte Paarungseffizienz der *tsc1Δ ssp2Δ* -, *tsc2Δ ssp2Δ* - bzw. *tsc1Δ tsc2Δ ssp2Δ* - Mutante, in welche das für das *ssp2⁺* - Gen enthaltene Plasmid transformiert wurde, erklären.

Diese Beobachtungen zeigten sich auch bei zusätzlicher Behandlung des Paarungsansatzes mit Glusulase. Glusulase führt zu einem Abtöten vegetativ wachsender Zellen, wohingegen Sporen resistent gegenüber dieser Behandlung sind. In der *ssp2Δ* - Mutante, in der die jeweiligen Plasmide transformiert wurden, konnten keine ausgekeimten Sporen bestimmt werden (Abb. 3.18 B). Des Weiteren konnte in den verschiedenen *tscΔ ssp2Δ* - Doppel- bzw. Triplemutanten + Leervektor eine Suppression des Verlustes der Sporulationsfähigkeit beobachtet werden. Auch führte die Transformation des Plasmides, welches das *tsc1⁺* -, das *tsc2⁺* - oder das *ssp2⁺* - Gen exprimiert, zu keiner Zunahme der ausgekeimten Sporen. Die *tsc1Δ ssp2Δ* -, *tsc2Δ ssp2Δ* - bzw. *tsc1Δ tsc2Δ ssp2Δ* - Mutante, in welche das *tsc1⁺* - oder *tsc2⁺* - enthaltene Plasmid transformiert wurde, verhielten sich wie eine *tscΔ ssp2Δ* - Mutante.

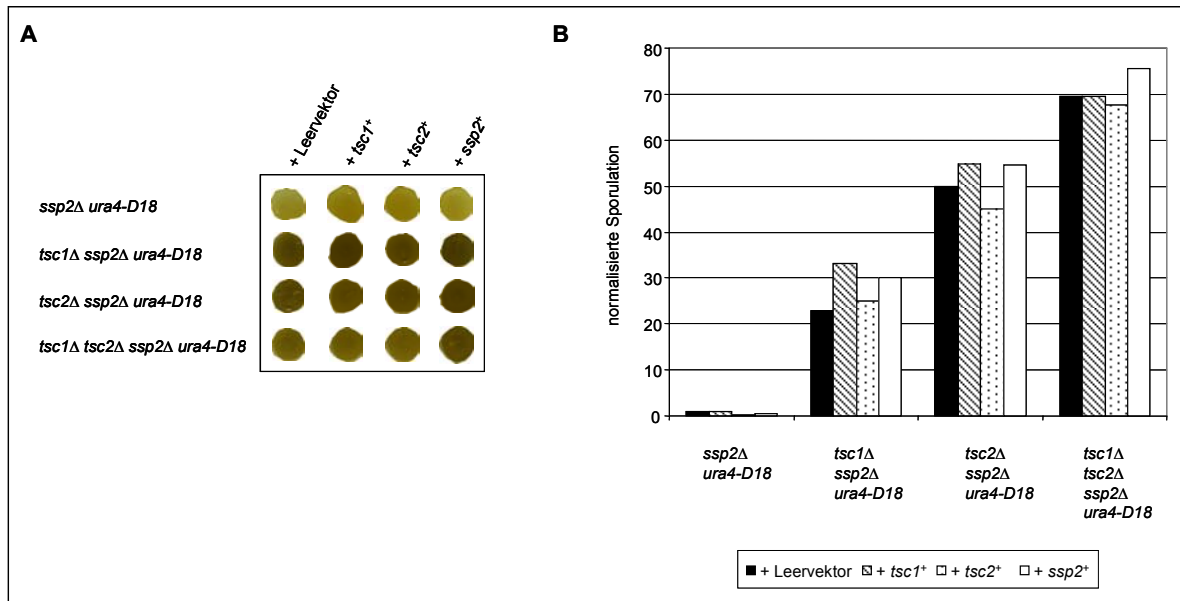


Abbildung 3.18: Analyse zur Paarungseffizienz in den verschiedenen *ssp2*-Mutanten. **A:** In die *S. pombe*-Stämme *ssp2Δ ura4-D18* (SPKS33-2C), *tsc1Δ ssp2Δ ura4-D18* (SPK23-5D), *tsc2Δ ssp2Δ ura4-D18* (SPKS35-5A), *tsc1Δ tsc2Δ ssp2Δ ura4-D18* (SPKS29-8C) wurde der Leervektor (pUR18), ein Plasmid, welches das *tsc1*⁺-Gen (pAD9), das *tsc2*⁺-Gen (pAD10) oder das *ssp2*⁺-Gen enthält, transformiert. Anschließend wurden die transformierten Stämme für 18 h in selektiven EMM-Medium angezogen, mit dem gleichen Volumen (2×10^7 Zellen) an Wildtypzellen mit entgegengesetztem Paarungstyp gemischt und auf Malzextraktplatten getropft. Die Platten wurden für 48 h bei 25 °C inkubiert und anschließend mit Joddampf angefärbt. **B:** Zur Quantifizierung der Sporenbildung wurden $2,5 \times 10^6$ Zellen für 17 h bei RT mit Glusulase behandelt. Anschließend wurden diese auf YE-Nährböden ausgestrichen und für 5-7 Tage bei 30 °C inkubiert. Resultierend aus der Anzahl der nach Glusulasebehandlung ausgekeimten Sporen wurde die Paarungseffizienz des jeweiligen mit dem Leervektor transformierten Stammes auf 1 gesetzt.

3.2.10. Untersuchungen zur Expression durch Stickstofflimitation induzierter Gene

In den vorangegangenen Analysen stellte sich heraus, dass der Verlust der Ssp2-Funktion zu einem Defekt in der Konjugation und sexuellen Differenzierung in Antwort auf Stickstoffhunger führt. Dieser Verlust konnte durch die zusätzliche Deletion des *tsc1*⁺- und / oder des *tsc2*⁺-Gens supprimiert werden. Aus diesem Grund wurde die Expression verschiedener durch Stickstoffhunger-induzierter Gene, bei denen ein verändertes Expressionsmuster in den verschiedenen TOR-Signalweg-Mutanten beschrieben wurde, untersucht. So führte eine Inaktivierung sowohl von *rhb1*⁺ als auch von *tor2*⁺ zu einer erhöhten Expression des durch Stickstoffhunger-induzierten Gens *ste11*⁺ (Alvarez and Moreno, 2006). Zwar führte eine Deletion von *tor1*⁺ zu keinem veränderten Expressionsmuster des durch Stickstoffhunger-induzierten Gens *ste11*⁺, jedoch resultierte eine Überexpression von *ste11*⁺ in *tor1Δ* in einer sehr schwachen Suppression des Paarungsdefektes der *tor1Δ*-Mutante (Kawai *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde die Expression der durch Stickstoffhunger-induzierten Gene *isp5*⁺ und *isp4*⁺ (Sato *et al.*, 1994) in den verschiedenen *ssp2*⁺- und *tsc*⁺-Mutanten untersucht. Dabei wurde die mittels „Northernblot“-Analyse untersuchte Expression der Gene *ste11*⁺ und *isp5*⁺ von A. Dierkes durchgeführt. Die folgenden Untersuchungen zur näheren Charakterisierung des Expressionslevels der durch Stickstofflimitation-induzierten Gene in den verschiedenen *ssp2*-Mutanten wurde in Anlehnung

an bereits beschriebene Analysen nach 6 h Stickstoffhunger durchgeführt (Kawai *et al.*, 2001; Nakase *et al.*, 2006).

Da die Expression von *ste11*⁺ erst durch eintretenden Stickstoffhunger induziert wird, sollte unter Normalbedingungen (EMM NH₄Cl - Medium) keine Änderung in der Expression des *ste11*⁺ -Gens zu verzeichnen sein. Dies konnte mittels der „Northernblot“-Analyse bestätigt werden (Abb. 3.19). Nach eintretendem Stickstoffhunger konnte eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors *ste11*⁺ in der *ssp2Δ* - Mutante verzeichnet werden. Dieser ist nur minimal gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 3.19). Dahingegen ist der Expressionslevel von *ste11*⁺ in der *tsc1Δ* - und *tsc2Δ* - Mutante stark reduziert. Zusätzlich weisen die *tsc1Δ ssp2Δ* - und die *tsc2Δ ssp2Δ* - Mutanten denselben stark reduzierte Expressionslevel wie die *tsc1*⁺ - und *tsc2*⁺ - Einzelmutanten auf. Neben der Expression von *ste11*⁺ wurde auch die Expression des *isp5*⁺ - Gens untersucht. Die Expression von *isp5*⁺ wird erst nach eintretendem Stickstoffhunger induziert (Abb. 3.19). Im Vergleich zum Wildtyp ist eine leicht verminderte Expression von *isp5*⁺ in der *ssp2Δ* - Mutante zu beobachten (Abb. 3.19). Ähnlich der *ste11*⁺ - Expression führt Stickstofflimitation zu einem reduzierten *isp5*⁺ - Expressionslevel in der *tsc1Δ* - und *tsc2Δ* - sowie in den *tsc1Δ ssp2Δ* - und *tsc2Δ ssp2Δ* - Mutanten. Des Weiteren wurde die Expression des *isp4*⁺ - Gens untersucht. Gleich der *isp5*⁺ - Expression wird die Expression des *isp4*⁺ - Gens erst nach eintretender Stickstofflimitation induziert (Abb. 3.19) und resultiert in einer reduzierten Expression des *isp4*⁺ - Genes in der *tsc1Δ* - und *tsc2Δ* - sowie in den *tsc1Δ ssp2Δ* - und *tsc2Δ ssp2Δ* - Mutanten. Im Gegensatz zu der Expression von *ste11*⁺ und *isp5*⁺ in der *ssp2*⁺ - Deletionsmutante führt eine Stickstofflimitation im Vergleich zum Wildtyp zu keiner signifikanten Änderung im Expressionslevel von *isp4*⁺.

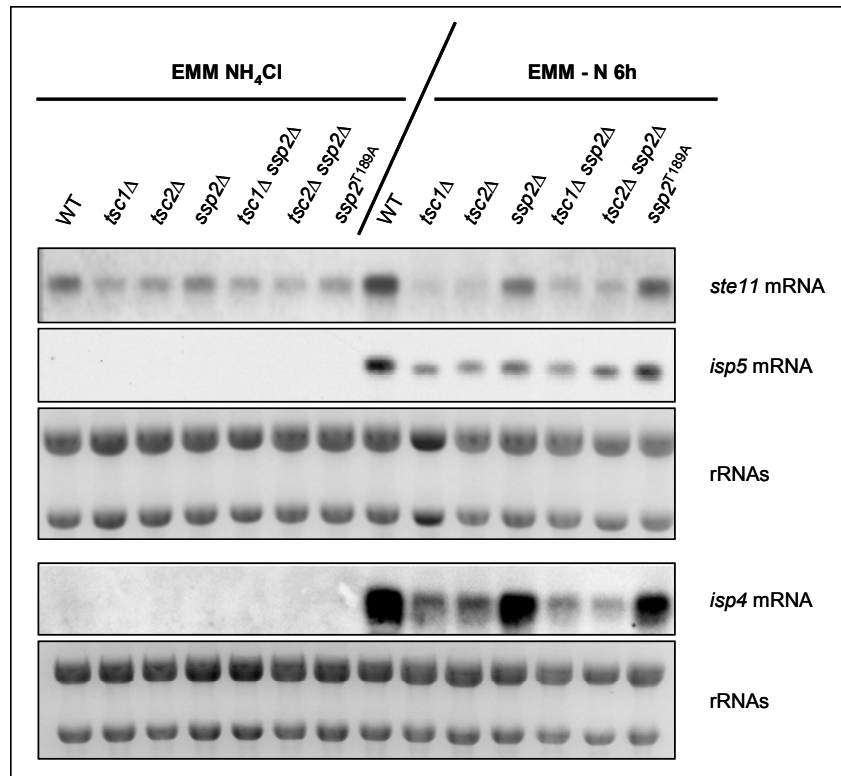


Abbildung 3.19: Expression ausgewählter Gene nach Stickstofflimitation in verschiedenen Mutanten. Die *S. pombe* - Stämme WT (972), *tsc1Δ* (SpAD1-4), *tsc2Δ* (SPKS26-6A), *tsc1Δ tsc2Δ* (SPAD36-1B) (A), *ssp2Δ* (SPKS23-3B), *tsc1Δ ssp2Δ* (SPKS23-3A), *tsc2Δ ssp2Δ* (SPKS39-5D), *tsc1Δ tsc2Δ ssp2Δ* (SPKS48-1) und *ssp2^{T189A}* (SPKS46-4) wurden für 18 - 22 h in EMM - Medium mit NH_4Cl bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,2$ angezogen und in EMM - Medium ohne Stickstoff für 6 h umgesetzt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA extrahiert und der „Northern Blot“ durchgeführt. Die Membran wurde mit spezifischen DNA-Sonden für die *ste11*, *isp5* und *isp4* mRNA hybridisiert.

3.2.11. Verbindung von Ssp2 zum TSC / TOR - Signalweg

3.2.11.1. Phänotypische Auswirkungen einer *ssp2⁺* - Deletion in einer temperatursensitiven *tor2* - Mutante

Die durchgeführten Wachstumsanalysen zeigten, dass eine Hyperaktivierung des TSC -/ Rhb1 - Signalweges zu einer Suppression der Wachstumsdefekte einer *ssp2Δ* - Mutante führt. Jedoch konnte nicht differenziert werden, ob Ssp2 oberhalb des TSC - Komplex agiert oder ob Ssp2 und der TSC - Komplex in parallelen Signalwegen zur Regulation des Zellwachstums beteiligt sind. Aufgrund dessen wurden die phänotypischen Auswirkungen einer *ssp2⁺* - Deletion in einer temperatursensitiven *tor2* - Mutante (*tor2^{ts}*) untersucht. Zu diesem Zweck wurden Nährböden mit Reagenzien versetzt, welche einen Wachstumsphänotyp in einer *ssp2⁺* - Deletionsmutante hervorrufen (Abb. 3.12) und anschließend bei einer für die *tor2^{ts}* - Mutante permissiven Temperatur (25°C) inkubiert (Abb. 3.20 A). Unter diesen Bedingungen konnte eine leichte Resistenz der *tor2^{ts}* - Mutante gegenüber Canavanin und Ethionin verzeichnet werden (Abb. 3.20 A). In Anwesenheit von NaCl zeigte die *tor2^{ts}* - Mutante im Gegensatz zu den *tsc* - Deletionen (Abb. 3.20 A) eine leicht verstärkte Resistenz bei 25 °C. Dies zeigt, obwohl die Mutante als temperatursensitiv beschrieben ist, sie noch andere Defekte und / oder zusätzliche Funktionen bei der permissiven Temperatur und verschiedenen Stressbedingungen zeigt. Wurde Glukose gegen

Raffinose ersetzt, wies die temperatursensitive *tor2* - Mutante das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp auf. Ebenso in der Anwesenheit von 2-DOG verhielt sich die *tor2^{ts}* - Mutante im Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Da die Deletion des *ssp2⁺* - Genes in einem temperatursensitiven Verhalten bei 37 °C resultiert, konnte die phänotypische Auswirkung einer zusätzlichen Deletion von *ssp2⁺* in der *tor2^{ts}* - Mutante unter restriktiven Bedingungen (37 °C) nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde eine intermediäre Temperatur, die zu einer partiellen Inaktivierung der Tor2 - Funktion (Alvarez and Moreno, 2006), aber nicht in einem Wachstumsdefekt der *ssp2Δ* - Mutante resultiert, gewählt (Abb. 3.12). Unter diesen Bedingungen wurde die bei 25°C beobachtete Resistenz der *tor2^{ts}* - Mutante gegenüber NaCl verstärkt (Abb. 3.20 B).

Das in der *ssp2Δ* - Mutante beobachtete Wachstumsverhalten gegenüber den hier getesteten Bedingungen steht im Widerspruch mit der zuvor beobachteten Sensitivität gegenüber diesen Substanzen (Abb. 3.12). Dies könnte darin begründet liegen, dass der Phänotyp der hier verwendeten *ssp2Δ* - Mutante zum Wildtyp - Phänotyp revertiert ist. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung dieser Wachstumsanalyse der Phänotyp der *ssp2Δ* - Mutante, wie in Abb. 3.12 beobachtet, herangezogen. Unter permissiven Bedingungen ist in einer *tor2^{ts} ssp2Δ* - Doppelmutante eine Additivität der für die *ssp2⁺* - Einzelmutante verzeichnete Resistenz gegenüber NaCl zu beobachten. Im Gegensatz dazu ist in der *tor2^{ts} ssp2Δ* - Doppelmutante eine leichte Suppression der Sensitivität von *ssp2Δ* gegenüber den toxischen Aminosäureanaloga Ethionin und Canavanin zu verzeichnen (Abb. 3.20 A). Erfolgte eine Inkubation der Stämme auf den verschiedenen Nährböden bei 30°C wurde sowohl die Suppression der Sensitivität gegenüber Canavanin und Ethionin als auch die NaCl - Resistenz verstärkt (Abb. 3.20 B). Dahingegen konnte unter permissiven Bedingungen als auch bei 30 °C keine Suppression des Wachstumsdefektes einer *ssp2Δ* - Mutante in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle (Raffinose) in der *tor2^{ts} ssp2Δ* - Doppelmutante beobachtet werden (Abb. 3.20 A + B).

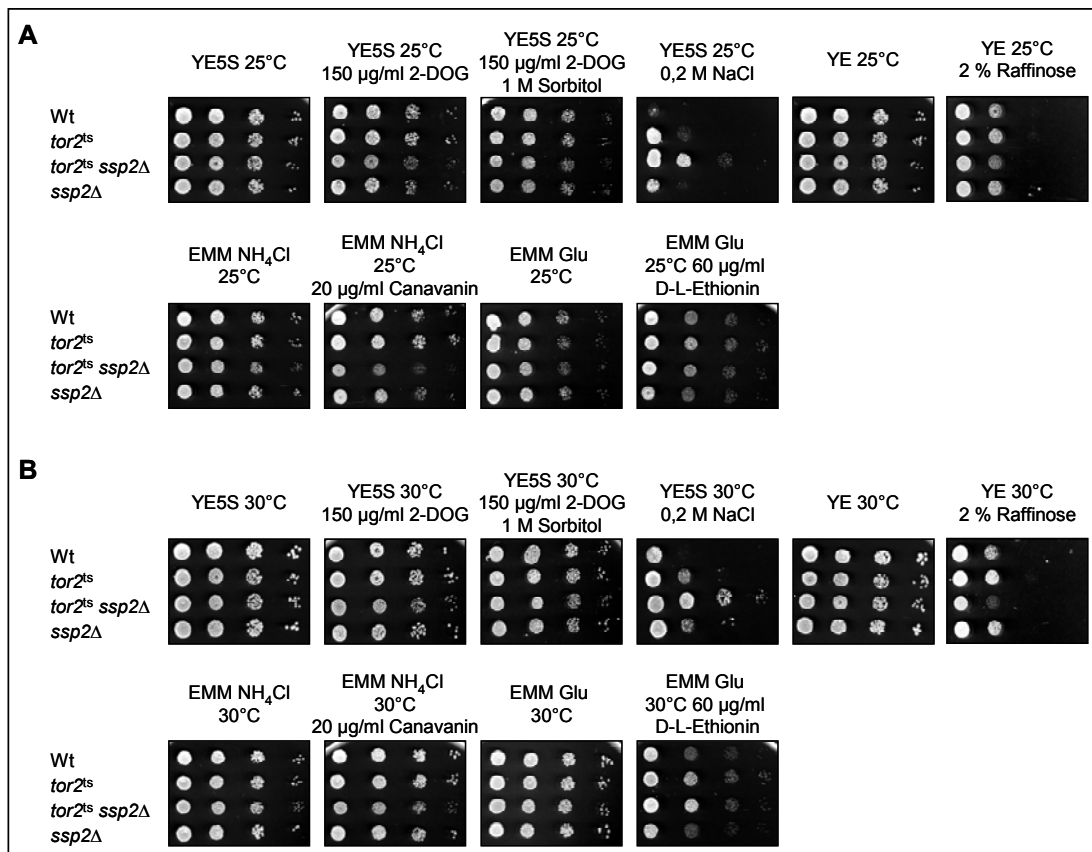


Abbildung 3.20: Einfluss einer Deletion des *ssp2⁺* - Gens in der *tor2^{ts}* - Mutante. A: Es wurden die *S. pombe* - Stämme WT (SPKS64-15), *tor2^{ts}* (S2010), *tor2^{ts} ssp2Δ* (SPKS59-9) und *ssp2Δ* (SPKS65-9) verwendet. Die Inkubation der Stämme auf den verschiedenen Nährböden erfolgte für 2 - 5 Tage bei 25 °C. **B:** Es wurden die *S. pombe* - Stämme WT (SPKS64-15), *tor2^{ts}* (S2010), *tor2^{ts} ssp2Δ* (SPKS59-9) und *ssp2Δ* (SPKS65-9) verwendet. Die Inkubation der Stämme auf den verschiedenen Nährböden erfolgte für 2 - 5 Tage bei 30 °C.

3.2.11.2. Einfluss einer *ssp2⁺* - Deletion auf das langsame Wachstumsverhalten der *tscΔ leu1-32* - Mutanten

In durchgeführten Wachstumsanalysen konnte gezeigt werden, dass die *tsc1Δ leu1-32* - und *tsc2Δ leu1-32* - Mutante auf Nährböden mit einer Leucinkonzentration von 50 µg/ml einen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp aufweisen (Matsumoto *et al.*, 2002). Dieser Wachstumsdefekt zeigt sich auf Vollmedium jedoch nicht. Um in einem weiteren Ansatz zu überprüfen, ob Ssp2 und die Tsc - Proteine womöglich in einem oder parallelen Signalwegen agieren, wurden sowohl die *tsc1Δ leu1-32* -, *tsc2Δ leu1-32* - und *ssp2Δ leu1-32* - Einzelmutanten als auch die *tscΔ ssp2Δ leu1-32* - Doppelmutanten auf ihr Wachstumsverhalten bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen getestet. In der Anwesenheit der Stickstoffquelle Ammonium wies die *ssp2Δ leu1-32* - Mutante bei unterschiedlichen Leucinkonzentrationen das gleiche Wachstumsverhalten wie der Leucin - auxotrophe Wildtypstamm (*leu1-32*) auf (Abb. 3.21 A). Im Gegensatz dazu konnte in den *tscΔ leu1-32* - Mutanten kein Wachstum sowohl bei niedrigen als auch hohen Leucinkonzentrationen beobachtet werden. Die zusätzliche Deletion des *ssp2⁺* - Gens resultierte in den *tscΔ leu1-32* - Mutanten in dem gleichen Wachstumsverhalten wie für die *tscΔ leu1-32* - Einzelmutante beschrieben (Abb. 3.21 A). Da in *S. pombe* -

Wildtypzellen die Anwesenheit von Ammonium als Stickstoffquelle zu einer deutlichen Reduzierung der Leucinaufnahme im Vergleich zu Prolin als Stickstoffquelle führt (Karagiannis *et al.*, 1999), wurde Ammonium gegen die Stickstoffquelle Prolin ersetzt. Dabei zeigte sich, dass die zusätzliche Deletion des *ssp2⁺* - Gens in den *tsc1 leu1-32* - Mutanten mit 20 µg/ml oder 50 µg/ml Leucin zu einer Suppression des Wachstumsdefektes führt (Abb. 3.21 B). Ab einer Konzentration von 200 µg/ml Leucin in den EMM - Prolin - Nährböden waren keine Unterschiede im Wachstumsverhalten der jeweiligen *S. pombe* - Stämme mehr zu verzeichnen.

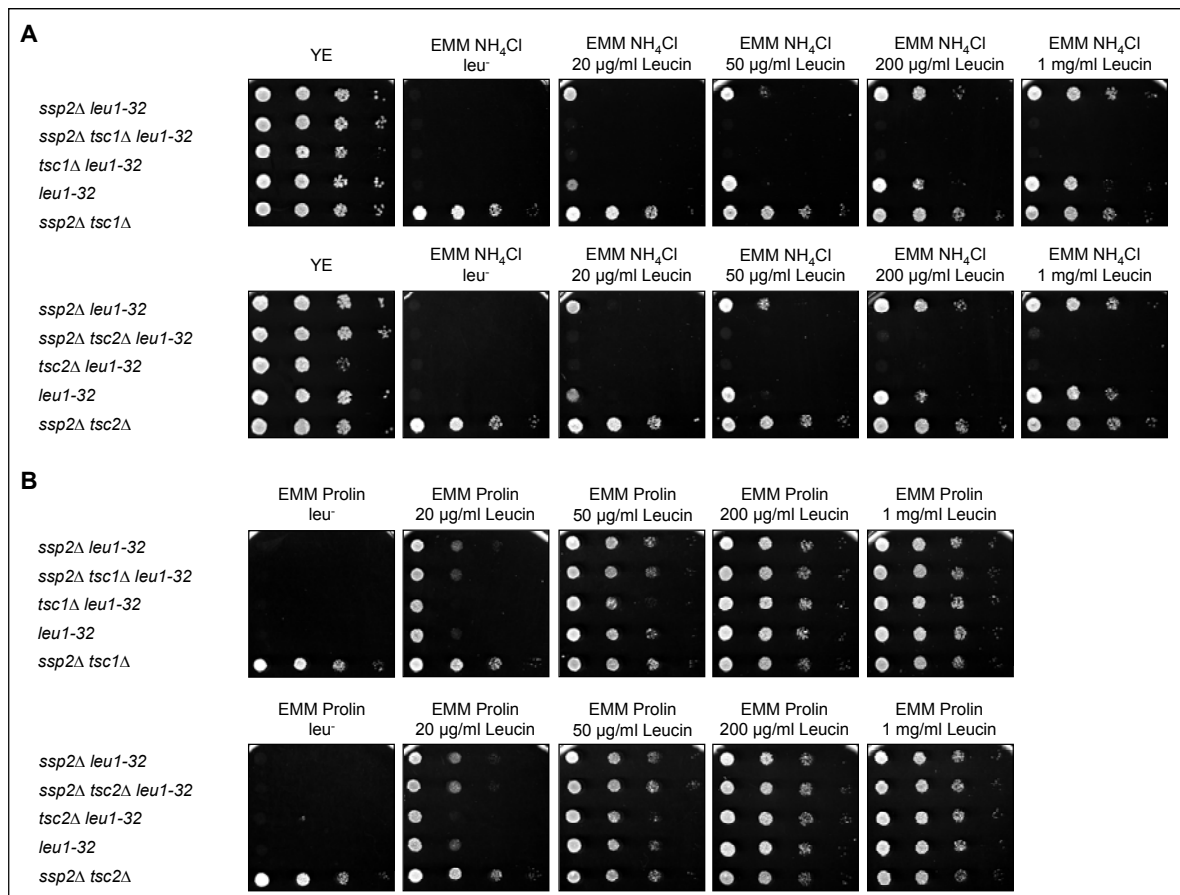


Abbildung 3.21: Einfluss einer *ssp2⁺* - Deletion auf das Wachstumsverhalten von *tsc1Δ leu1-32* - und *tsc2Δ leu1-32* - Mutanten. **A:** Die *S. pombe* - Stämme *ssp2Δ leu1-32* (SPKS102-7), *ssp2Δ tsc1Δ leu1-32* (SPKS70-8), *tsc1Δ leu1-32* (SPAD7-2B), *leu1-32* (SPAD87-39C) und *ssp2Δ tsc1Δ* (SPKS23-3A) wurden in YE - Medium bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ angezogen. Anschließend wurden diese auf EMM - Medium in der Anwesenheit von Ammonium (NH_4Cl) als Stickstoffquelle bei verschiedenen Leucinkonzentrationen auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. **B:** Die *S. pombe* - Stämme *ssp2Δ leu1-32* (SPKS102-7), *ssp2Δ tsc2Δ leu1-32* (SPKS38-2B), *tsc2Δ leu1-32* (SPAD29-2A), *leu1-32* (SPAD87-39C) und *ssp2Δ tsc2Δ* (SPKS39-5D) wurden in YE - Medium bis zu einer $OD_{600} \sim 0,6$ angezogen. Anschließend wurden diese auf EMM - Medium in der Anwesenheit von Prolin als Stickstoffquelle bei verschiedenen Leucinkonzentrationen auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. Die Inkubation der Stämme auf den verschiedenen Nährböden erfolgte für 4 Tage bei 30 °C.

3.2.12. Einfluss einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges in einer *ppk9Δ* - Mutante

Um eine mögliche Funktion der zweiten potentiellen Isoform der AMPK α (Ppk9) innerhalb des TOR - Signalweges zu untersuchen, wurden verschiedene *tsc ppk9* - Deletionsmutanten auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. Es zeigte sich, dass sich sowohl die *tsc1Δ ppk9Δ* -, die *tsc2Δ ppk9Δ* - als auch die *tsc1Δ tsc2Δ ppk9Δ* - Mutanten wie *tsc* - Einfachmutanten verhalten. Eine zusätzliche Deletion des *tsc1⁺* - und / oder des *tsc2⁺* - Gens in der *ppk9Δ* - Mutante führt zu einer Resistenz gegenüber 2-DOG und Ethionin und zu einer Toleranz bei erhöhter Temperatur (37°C) (Abb. 3.22). Die hier getesteten Wachstumsbedingungen deuten jedoch an, dass der Phänotyp einer *tsc⁺* - Einzeldelation in den *tscΔ ppk9Δ* - Doppel- bzw. Triplemutanten dominiert. In dieser Wachstumsanalyse wurde der Effekt von Cadmium auf die verschiedenen *tsc ppk9Δ* - Mutanten aus Zeitgründen nicht mehr untersucht. Somit wäre es dennoch möglich, dass Ppk9 und der TSC - Komplex in Antwort auf Cadmiumstress gleiche oder ähnliche Funktionen in der Zelle ausüben.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass diese genetische Analyse nicht darauf hindeutet, dass Ppk9 und der TSC - Komplex gleiche oder ähnliche Funktionen in der Zelle ausüben.

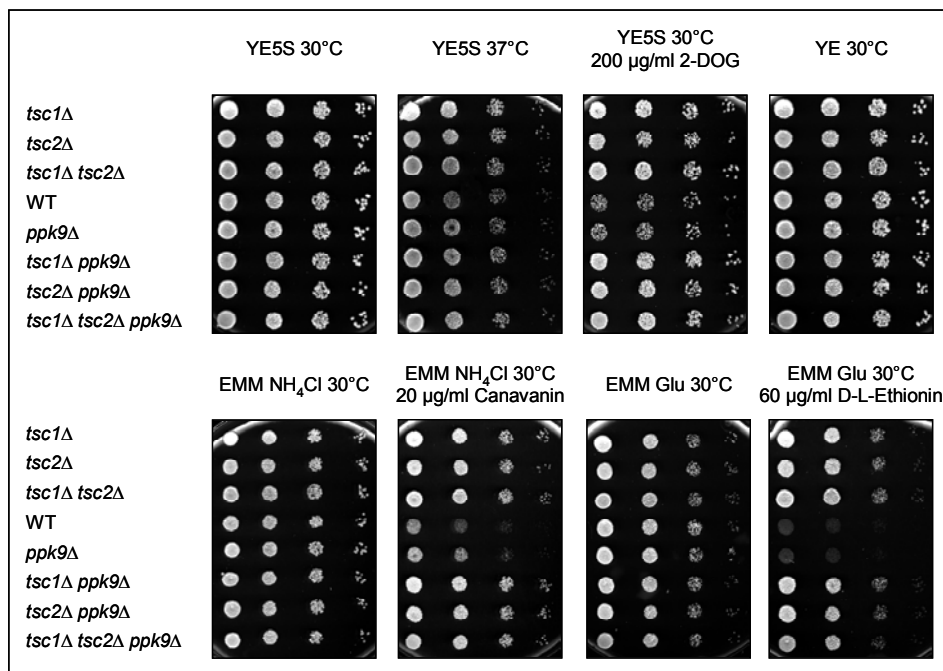


Abbildung 3.22: Effekt einer Hyperaktivierung des TOR - Signalweges in der *ppk9⁺* - Deletionsmutante. Es wurden die *S. pombe* - Stämme *tsc1Δ* (SpAD1-4), *tsc2Δ* (SPKS26-6A), *tsc1Δ tsc2Δ* (SPAD36-1B), WT (972), *ppk9Δ* (SPKS98-2C), *tsc1Δ ppk9Δ* (SPKS100-1A), *tsc2Δ ppk9Δ* (SPKS100-3B) und *tsc1Δ tsc2Δ ppk9Δ* (SPKS100-1D) verwendet. Die Inkubation der Stämme auf den verschiedenen Nährböden erfolgte für 2 - 4 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C.

3.3. Identifizierung neuer Tsc1 - oder Tsc2 - bindender Proteine in *S. pombe* mittels der „TAP“ - Reinigung

Zur Identifizierung neuer Bindungspartner des Tsc1 - und Tsc2 - Proteins wurde die „TAP“ - Reinigung verwendet (Puig *et al.*, 2001). Dabei wurden Stämme verwendet, bei denen das *tsc1*⁺ - oder das *tsc2*⁺ - Gen unter dem eigenen Promotor exprimiert werden und genomisch am 3'-Ende mit einer Sequenz fusioniert ist, die für zwei Epitope kodiert, den so genannten „TAP-Tag“. Dieser setzt sich aus dem Calmodulin - Bindepeptid und zwei IgG - Bindepeptiden zusammen. Dadurch ist es möglich, über zwei verschiedene Säulenmaterialien zwei Reinigungen hintereinander durchzuführen (Puig *et al.*, 2001). Die *S. pombe* - Stämme, die das Tsc1-TAP - bzw. Tsc2-TAP - Fusionsprotein produzieren, zeigten in vorangegangenen Wachstumsanalysen kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (Anhang, Abb. 8.1). Daher kann ein Einfluss des Fusionsanteils auf die Funktion des Tsc1 - und des Tsc2 - Proteins ausgeschlossen werden.

Das Tsc1-TAP - Fusionsprotein konnte mittels IgG - Sepharose immunpräzipitiert werden (Abb. 3.23 A, RE). Mittels der anschließenden „TAP“ - Reinigung konnte das Tsc1-TAP - Fusionsprotein erfolgreich gereinigt werden, jedoch fand hier ein enormer Verlust des zu reinigenden Tsc1-TAP - Fusionsproteines statt. Im Durchfluss des mittels IgG - Sepharose gereinigten Rohextraktes konnte eine große Menge des Tsc1-TAP - Fusionsproteines mittels des α -protA - Primärantikörper detektiert werden (Abb. 3.23 A, P1). Auf SDS - Gelen konnte mittels Silberfärbung eine weitere ko - eluierende Bande bei ca. 30 kDa detektiert werden (Abb. 3.23 B). Das Tsc1 - TAP - Fusionsprotein konnte bei einem apparenten Molekulargewicht von ~110 kDa detektiert werden.

Auch das Tsc2-TAP - Fusionsprotein konnte mittels IgG - Sepharose immunpräzipitiert werden (Abb. 3.23 C, RE). Jedoch fand auch hier ein enormer Verlust des zu reinigenden Tsc2-TAP - Fusionsproteines statt (Abb. 3.23 C, P1). Mittels Silberfärbung des SDS - Gels konnten drei weitere ko - eluierende Banden bei ca. 60 kDa, 40 kDa und bei 35 kDa detektiert werden (Abb. 3.23 D). Das Tsc2 - TAP - Fusionsprotein konnte bei einem apparenten Molekulargewicht von ~150 kDa detektiert werden.

Sowohl in der Reinigung des Tsc1 -TAP - als auch des Tsc2 - TAP - Fusionsproteines waren die Proteinmengen zu gering für eine massenspektrometrische Identifizierung der Proteine. Zur Identifizierung der ko - eluierenden Proteine wäre sowohl eine Optimierung der „TAP“ - Reinigung als auch eine Aufreinigung im Großmaßstab nötig (Proteinpräparation aus einer 30 - 50 l - Kultur). Auf diese wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen verzichtet.

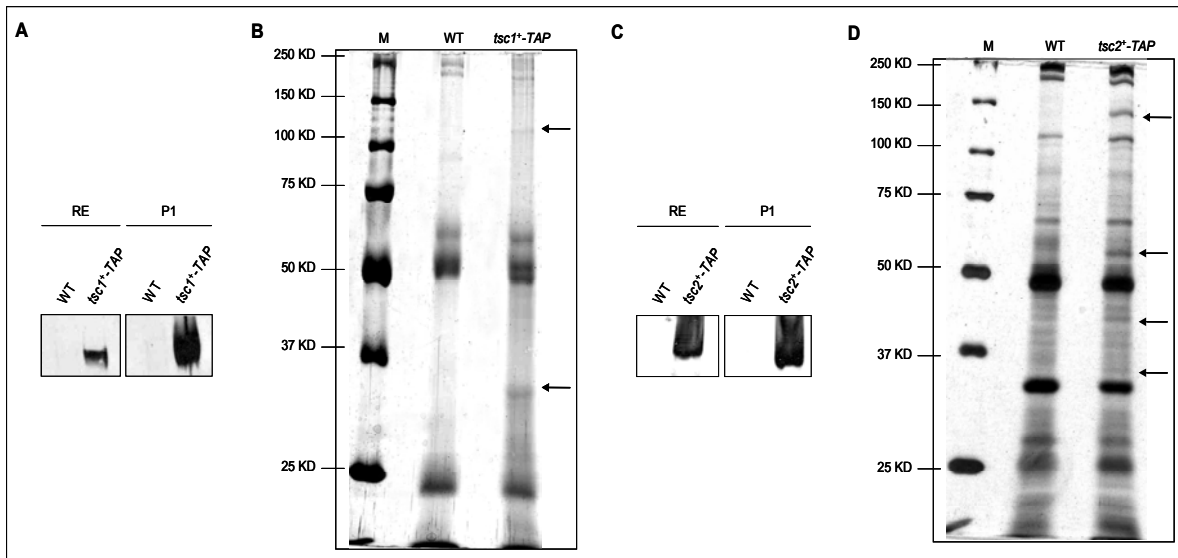


Abbildung 3.23: Reinigung von Tsc1 und Tsc2 zur Identifizierung neuer Interaktionspartner. B + D: Die *S. pombe* - Stämme WT (972), SPKS8-1C (*tsc1⁺-TAP*) (A) und SPKS9-1A (*tsc2⁺-TAP*) (C) wurden bis zu einer $OD_{600} \sim 0,8$ in Y5 - Medium angezogen. Anschließend wurden die Rohextrakte gewonnen und die „TAP“-Reinigung durchgeführt. Die Eluate wurden über ein 10 %iges SDS - Gel aufgetrennt und die Proteinbanden mittels Silberfärbung angefärbt. **A + C:** Zur Kontrolle der „TAP“-Reinigung wurden die Rohextrakte vor Beginn der Aufreinigung (RE) und der Durchfluss der einzelnen Proben nach Inkubation des RE mit IgG - Sepharose (P1) mittels „Westernblot“-Analyse untersucht. Sowohl von den Rohextrakten als auch von P1 wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Anschließend wurden die Immunpräzipitate bei 96 °C für 5 min in SDS - Probenpuffer inkubiert und in einem 7,5 %igem SDS - Gel aufgetrennt. Die Detektion der Tsc-TAP - Fusionsproteine erfolgte mit dem α -protA - Primärantikörper. Das erwartete Molekulargewicht von Tsc1-TAP entspricht ~ 109 kDa, das von Tsc2-TAP ~ 160 kDa. M = Molekulargewichtsmarker. Die Pfeile zeigen das Tsc1 - / Tsc2 - Protein und die ko - eluierenden Proteine des jeweiligen Tsc - Proteins.

4. Diskussion

4.1. Funktionelle und biochemische Charakterisierung von Tsc1 und Tsc2 in *Schizosaccharomyces pombe*

Sowohl in Säugern als auch in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* spielt der TSC - Komplex eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellwachstums, indem er als negativer Regulator des TOR - vermittelten Signaltransduktionsweges fungiert. In *S. pombe* werden der G₁-Arrest, die sexuelle Entwicklung und die Regulation des Zellwachstums durch diesen Signaltransduktionsweg über die Registrierung von Nährstoffen reguliert (Petersen and Nurse, 2007; Matsuo *et al.*, 2007; Weisman *et al.*, 2006; Alvarez and Moreno, 2006; Uritani *et al.*, 2006; Nakase *et al.*, 2006; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2002; Weisman *et al.*, 2001; Kawai *et al.*, 2001). Entsprechend sind die TOR - Proteine in die Regulation verschiedener Signale, wie Stickstoffmangel, Osmoschock, Hitzeschock, oder Pheromone involviert (Abb. 1.7; Matsuo *et al.*, 2007; Alvarez and Moreno, 2006; Uritani *et al.*, 2006; Kawai *et al.*, 2001; Weisman and Choder, 2001). In Säugern wird der TOR - Signaltransduktionsweg durch die hohe spezifische GAP - Aktivität des TSC - Komplexes für die GTPase Rheb negativ reguliert (Inoki *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2003, Garami *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2003). Die GAP - Domäne des Tsc2 - Proteins in *S. pombe* ist mit 39 % Identität zum menschlichen TSC2 - Protein teilweise konserviert (Matsumoto *et al.*, 2002). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese negative Regulation in *S. pombe* durch den TSC - Komplex auch wie in Säugern über die GTPase Rbh1 erfolgt (Nakase *et al.*, 2006; van Slegtenhorst *et al.*, 2005; Urano *et al.*, 2005). Da jedoch noch keine Untersuchungen zur Regulation des TSC - Komplexes vorlagen, sollte die vorliegende Arbeit einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der Aktivität des TSC - Komplexes in *S. pombe* liefern. Im Gegensatz zu Säugern muss *S. pombe* keine Wachstumsfaktor - induzierten Signale, wie zum Beispiel Insulin, verarbeiten, hingegen aber die Adaption des Zellwachstums an das Nährstoffangebot. Somit lag die Vermutung nahe, dass der nährstoffinduzierte Mechanismus über den TSC - Komplex konserviert ist. Aus diesem Grund wurde die Beteiligung des Tsc1 - und Tsc2 - Proteins an der Aminosäureaufnahme und bei der Adaption an Energiemangel in *S. pombe* näher untersucht.

In *S. pombe* führt eine Deletion des *tsc1*⁺ - bzw. des *tsc2*⁺ - Gens zu einer stark verminderten Aufnahme der Aminosäure Arginin, so dass der TSC - Komplex über den TOR - Signaltransduktionsweges vermutlich an der Aufnahme von Arginin beteiligt ist (van Slegtenhorst *et al.*, 2004). So führt eine Deletion des *tsc1*⁺ - bzw. des *tsc2*⁺ - Gens zu einer Resistenz gegenüber dem toxischen Aminosäureanalog des Arginins (Canavanin). Allerdings prägte sich diese Resistenz nur aus, wenn Ammoniumchlorid und nicht Glutamat als Stickstoffquelle verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde gezeigt, dass konditionale *tor2* - Mutanten unter restriktiven Bedingungen Phänotypen wie Stickstoff - gehungerte Zellen aufweisen (Matsuo *et al.*, 2007; Weisman *et al.*, 2007; Álvarez and Moreno, 2006; Uritani *et al.*, 2006). Des Weiteren zeigen die *tsc* - Deletionsmutanten eine Resistenz gegen die toxischen Aminosäureanaloge von Lysin, Tryptophan, Methionin und Phenylalanin

(A. Dierkes, persönliche Mitteilung). Dies lässt vermuten, dass die Deletion des *tsc1⁺* - und / oder des *tsc2⁺* - Gens nicht nur zu einem Defekt in der Argininaufnahme, sondern auch zu einem Defekt in der Aufnahme der Aminosäuren Lysin, Tryptophan, Methionin und Phenylalanin führt. Kürzlich wurde gezeigt, dass eine *tsc1Δ* - und *tsc2Δ* - Mutante eine stark verringerte Aufnahme der basischen Aminosäure Lysin zeigt (Aspuria and Tamanoi, 2008). Zusätzlich führt eine Inhibierung der GTPase Rhb1 zu einer Hypersensitivität gegenüber dem toxischen Aminosäureanalogon für Lysin (Urano *et al.*, 2005). Diese beiden Studien bestärken den vermuteten Lysinaufnahmedefekt einer *tsc1Δ* - und *tsc2Δ* - Mutante.

In Säugern wird TSC2 von der AMP - abhängigen Kinase in Antwort auf Energiemangel phosphoryliert (Inoki *et al.*, 2003a). Diese Phosphorylierung führt zu einer Stabilisierung des TSC - Komplexes und damit zu dessen Aktivierung als negativer Regulator des TOR - Signalweges. Um einen Einblick in die Funktion der Tsc - Proteine in *S. pombe* zu erhalten, wurden die *tscΔ* - Mutanten in ihrem Wachstum gegenüber dem toxischen Glukoseanalogon 2-DOG untersucht. In Säugern wird 2-DOG wie Glukose in die Zelle transportiert und zu 2-Deoxyglukose-6-Phosphat phosphoryliert. Jedoch kann es nicht über die im Kohlenhydratmetabolismus involvierten Enzyme, welche Glukose-6-Phosphat, jedoch nicht 2-Deoxyglucose-6-Phosphat verstoffwechseln, weiter metabolisiert werden (Gee *et al.*, 1974; Mekkada and Bonventre, 1975). In Folge kommt es zu einer eintretenden Energielimitation. Ein steigendes AMP / ATP - Verhältnis führt schließlich zur Aktivierung der AMPK (Dennis *et al.*, 2001; Inoki *et al.*, 2003a). In *S. pombe* ist nicht bekannt, ob die Zugabe von 2-DOG zu einer Energielimitation führt. Da eine *S. pombe* Hexosekinase - Mutante eine Resistenz gegenüber 2-DOG aufweist, wird zwar spekuliert, dass der inhibitorische Effekt von 2-DOG auf das Zellwachstum auf die enzymatische Umwandlung von 2-DOG zu 2-Deoxyglukose-6-Phosphat zurückzuführen ist, jedoch wurden dazu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt (Megnet *et al.*, 1965). Eher scheint der inhibitorische Effekt von 2-DOG zur Zellwandlyse zu führen, verursacht durch die Inhibierung einiger Reaktionen, die zur Bildung der Vorstufen für Zellwandpolysaccharide benötigt werden (Megnet *et al.*, 1965). Diese eintretende Zellwandlyse konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden. Während eine Konzentration von 100 µg/ml zu keiner Inhibierung des Zellwachstums der *S. pombe* - Wildtypzellen führte und keine Zellwandlyse zu verzeichnen war, führte eine Konzentration von 150 µg/ml und 200 µg/ml zu einem Wachstumsdefekt und einer drastischen Zellwandlyse (Anhang, Abb. 8.2).

Ob neben dem primären Effekt von 2-DOG auf die Zellwandstabilität auch eine eintretende Energielimitierung vorliegt, könnte die Bestimmung einer möglichen intrazellulären Zunahme der AMP - Konzentration von 2-DOG - behandelten Wildtypzellen zukünftig klären.

In Säugern und auch in *Drosophila* stellen sowohl die subzelluläre Lokalisation als auch verschiedene Phosphorylierungsereignisse des TSC - Komplexes weitere Regulationsmöglichkeiten der funktionellen Aktivität des TSC - Komplexes dar. So wird beispielsweise in Säugern nach Stimulation

der Zelle mit Wachstumsfaktoren TSC2 durch Akt phosphoryliert. Biochemische Studien haben gezeigt, dass diese Phosphorylierung TSC2 in seiner Funktion inhibiert (Dan *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002) und die zytoplasmatische Lokalisation von TSC2 veranlasst (Rosner *et al.*, 2007). In *Drosophila* wird der dTSC - Komplex über die Bindung von Melted an dTsc1 an die Zellmembran rekrutiert (Teleman *et al.*, 2005). Ähnlich wie in Säugern wird in *Drosophila* dTsc2 durch die AMPK phosphoryliert und dadurch aktiviert. AMPK liegt über die myristoylierte β - Untereinheit membranassoziiert vor. Eine Rekrutierung von dTsc1 mittels Melted vermittelt somit den dTSC - Komplex in eine für die AMPK - abhängige Phosphorylierung notwendige räumliche Nähe (Teleman *et al.*, 2005). In Folge dessen wird die Aktivität des dTSC - Komplexes und somit die Aktivität von dTor moduliert. Aufgrund der Konservierung des TOR - Signalweges wäre in *S. pombe* eine Regulation der Aktivität des TSC - Komplexes über die subzelluläre Lokalisierung und Phosphorylierung durchaus denkbar. Die Sequenz des Tsc1 - und Tsc2 - Proteins weist sehr viele Serin-, Threonin- und Tyrosin- Phosphorylierungsstellen auf (Abb. 3.1 A + B). Unter diesen ist durch Erk phosphoryliertes S664 des menschlichen TSC2 - Proteins in *S. pombe* Tsc2 konserviert (S664 entspricht S678, Abb. 3.1 B). Durch die Erk - vermittelte Phosphorylierung des TSC2 - Proteins wird der TSC - Komplex in seiner Funktion als negativer Regulator des mTOR - Signalweges inhibiert (Ma *et al.*, 2005). Auch die Phosphorylierungsstellen T1227 und S1704 des menschlichen TSC2 - Proteins, welche in Säugern bei Energiemangel durch die AMPK phosphoryliert werden, sind im Tsc2 - Protein von *S. pombe* konserviert (T1227 entspricht T1046, S1704 entspricht S1260, Abb. 3.1 B). Im Zuge dieser Arbeit konnte eine Phosphorylierung der beiden Tsc - Proteine unter Normalbedingungen demonstriert werden (Abb. 3.1 C). Dies lässt vermuten, dass die funktionelle Aktivität des TSC - Komplexes auch in *S. pombe* durch eine oder mehrere Kinasen reguliert wird.

Eine Fraktionierung des *S. pombe* - Zellysates zeigte, dass sowohl Tsc1 als auch Tsc2 vorwiegend im Zytoplasma, aber auch zu einem geringen Anteil in der Membranfraktion vorliegen (Abb. 3.2). Ob Tsc1 oder Tsc2 membranassoziiert vorliegen oder mit einem Membranprotein interagieren, kann nicht unterschieden werden. Die Daten schließen nicht aus, dass der TSC - Komplex unter unstimulierenden Bedingungen entweder inaktiv oder dissoziiert im Zytoplasma lokalisiert vorliegt und beispielsweise erst eine eintretende Energie - oder Stickstofflimitation die Rekrutierung des TSC - Komplexes an die Zellmembran veranlasst. So wurde die Lokalisierung von Tsc1 und Tsc2 nach Zugabe von 2-DOG bzw. unter Stickstoffhunger untersucht. Da die erzielten Ergebnisse nicht reproduzierbar waren, können leider keine Rückschlüsse gezogen werden, ob ähnlich wie in Säugern oder *Drosophila*, Stressbedingungen zu Änderungen in der subzellulären Lokalisation der Tsc - Proteine in *S. pombe* führen.

4.2. Die AMP - aktivierte Kinase (AMPK) in *S. pombe*

4.2.1. Konservierung der AMPK - Komplexe

Die Snf1 / AMPK - Familie der Proteinkinasen ist in Eukaryoten hoch konserviert und ist für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen ATP - generierenden und ATP - verbrauchenden Prozessen zuständig. In Säugern die funktionelle Aktivität des TSC - Komplexes durch die AMPK - vermittelte Phosphorylierung des TSC2 - Proteins positiv reguliert (s. 1.1.6). Die Phosphorylierungsstellen T1227 und S1704 des menschlichen TSC2 - Proteins, die bei Energiemangel (2-DOG) durch die AMPK phosphoryliert werden, sind im Tsc2 - Protein in *S. pombe* konserviert (Abb. 3.1 B). In Anwesenheit von 2-DOG wurde bereits eine Resistenz der *tscΔ* - Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in *S. pombe* nachgewiesen (A. Dierkes, persönliche Mitteilung). Diese beiden Beobachtungen deuten darauf hin, dass ähnlich wie in Säugern der TSC - Komplex in *S. pombe* über ein potientielles Homologes der AMPK reguliert wird.

Sowohl in Säugern als auch in *S. cerevisiae* ist die AMPK als Heterotrimer aktiv und setzt sich aus einer katalytischen α - Untereinheit und den regulatorischen β - und γ - Untereinheiten zusammen. Während in Säugern, Insekten, Nematoden und Pflanzen mehrere Gene für das AMPK α - Homologe kodieren, weist das Genom von *S. cerevisiae* nur ein für das AMPK α - Homologe kodierendes Gen (*SNF1*; sucrose non - fermenting 1) auf (Carling et al., 1994; Woods et al., 1994; Mitchelhill et al., 1994; Celenza et al., 1986; Celenza et al., 1984). Anschließende Studien identifizierten drei regulatorische β - Untereinheiten (Sip1, Sip2, Gal83) und die γ - Untereinheit Snf4 (Yang et al., 1992; Erickson and Johnston, 1993; Yang et al., 1994; Celenza and Carlson, 1989; Celenza et al., 1989).

Um zu untersuchen, ob in *S. pombe* auch ein AMPK - Komplex existiert, wurde nach Homologen AMPK - Untereinheiten gesucht. Das Genom von *S. pombe* weist zwei Gene auf, die für das AMPK α - Homologe Gen kodieren und jeweils ein Gen, das für die regulatorischen Untereinheiten β oder γ kodiert. Eine potentielle α_1 - Untereinheit wird kodiert von *ssp2*⁺, die potentielle α_2 - Untereinheit von *ppk9*⁺, die β - Untereinheit von *SPCC1919.03c*⁺ und die γ - Untereinheit von *cbs2*⁺. Im Verlauf dieser Arbeit konnte durch die Arbeitsgruppe um Townley und Shapiro (2007) mittels Kristallstrukturanalysen die Bildung eines AMPK - Komplexes *in vitro* nachgewiesen werden. Die Kristallstruktur besteht hierbei aus einem Teil der potentiellen α - Untereinheit Ssp2 (As 440-576), einem Teil der potentiellen β - Untereinheit SPCC1919.03c (As 205-298) und der gesamten potentiellen γ - Untereinheit Cbs2. Auch konnte in derselben Studie, ähnlich wie in Säugern, die kompetitive Bindung von AMP und ATP an die γ - Untereinheit gezeigt werden.

Die Existenz zweier AMPK α - Homologe in *S. pombe* wirft die Frage auf, ob neben dem schon *in vitro* gezeigten AMPK - Komplex I ein weiterer AMPK - Komplex II existiert. Des Weiteren ist nicht geklärt, ob der AMPK - Komplex I auch *in vivo* vorliegt. Mittels Ko - Immunpräzipitation konnte sowohl ein AMPK - Komplex I vermutlich bestehend aus Ssp2, Cbs2 und SPCC1919.03c als auch ein AMPK - Komplex II vermutlich bestehend aus Ppk9, Cbs2 und SPCC1919.03c nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die potentiell regulatorischen

Untereinheiten SPCC1919.03c (β) und Cbs2 (γ) gleichzeitig in einem Komplex vorliegen (Abb. 3.5). Durch die Ko - Immunpräzipitation des gesamten AMPK - Komplexes konnte mit diesem Experiment jedoch nicht die direkte Interaktion der Untereinheiten untereinander geklärt werden. Allerdings wurde in der von Townley and Shapiro (2007) durchgeführten Kristallstrukturanalyse des AMPK - Komplexes eine Interaktion der C-terminalen Region der α - Untereinheit mit der β - Untereinheit nachgewiesen. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die C- terminale Region der katalytischen Untereinheit direkt mit der γ - Untereinheit interagiert (Amodeo *et al.*, 2007; Jiang and Carlson, 1996). Die γ - Untereinheit interagiert sowohl mit der α - Untereinheit als auch mit den β - Untereinheiten (Amodeo, *et al.*, 2007; Jiang and Carlson, 1997; Celenza *et al.*, 1989; Celenza and Carlson, 1989). Die β - Untereinheiten der *S. cerevisiae* AMPK enthalten konservierte C- terminale Sequenzen, die die Interaktion mit der α - Untereinheit vermitteln (Yang *et al.*, 1994). Ebenfalls in Säugern ist die C- terminale Region der α - und β - Untereinheit für die Bildung des AMPK - Komplexes erforderlich. Dahingegen existieren in Säugern zwei Modelle für die Bindung der γ - Untereinheit mit der α - und / oder β - Untereinheit in Säugern. Zum einen sind die β - und γ - Untereinheit auch in der Abwesenheit der katalytischen Untereinheit in der Lage, miteinander zu interagieren (Dyck *et al.*, 1996). Zum anderen konnte in einer weiteren Studie erst eine Interaktion der β - und γ - Untereinheit nach Ko - Expression der AMPK α nachgewiesen werden (Wong and Lodish, 2006). Basierend auf der Kristallstruktur des AMPK - Komplexes in *S. pombe* scheint die von Dyck *et al.* (1996) postulierte Zusammensetzung des AMPK - Komplexes von Säugern in *S. pombe* konserviert zu sein. Diese Zusammensetzung des AMPK - Komplexes würde auch der in *S. cerevisiae* entsprechen.

Dahingegen konnte die von Wong and Lodish (2006) postulierte Interaktion der β - und γ - Untereinheit der Säuger - AMPK in Abhängigkeit der katalytischen Untereinheit für *S. pombe* nicht gezeigt werden, da die Interaktion der β - und γ - Untereinheit in der Kristallstruktur des *S. pombe* AMPK - Komplexes nicht in der Abwesenheit der katalytischen Untereinheit untersucht wurde (Townley and Shapiro, 2007). Zur Klärung sind weiterführende Studien *S. pombe* notwendig. Zum einen könnte mittels des „Di-Hybrid-Systems“ die direkte Interaktion der Untereinheiten untersucht werden, zum anderen mittels Ko - Immunpräzipitation in einer *ppk9*⁺- bzw. *ssp2*⁺- Deletionsmutante. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass trotz der nicht geklärten direkten Interaktion der potentiellen regulatorischen Untereinheiten untereinander, die Konservierung und das Vorkommen zweier AMPK - Komplexe *in vivo* in *S. pombe* demonstriert werden konnte (Abb. 4.1).

Interessanterweise konnte eine Abnahme der posttranslational modifizierten Form der β - Untereinheit in der *ssp2*⁺- Deletionsmutante beobachtet werden. Sowohl die modifizierte als auch die unmodifizierte Form der β - Untereinheit liegen im AMPK - Komplex I vor. Im Gegensatz dazu führte eine Deletion des für die α_2 - kodierenden *ppk9*⁺- Gens nicht zu einer Abnahme der modifizierten Form der β - Untereinheit. In Säugern wurden verschiedene Studien eines potentiellen Effektes

posttranslationaler Modifikationen auf die physiologische Funktion der AMPK durchgeführt. Im Zuge dessen wurde der native Modifikationszustand der β - Untereinheit charakterisiert. Die AMPK β liegt in einer Mischung aus di- und triphosphorylierten Formen vor (Mitchelhill *et al.*, 1997). Einerseits postuliert diese Arbeitsgruppe die Phosphorylierung der β - Untereinheit durch eine intramolekulare Autophosphorylierung. Andererseits ist es möglich, dass die β - Untereinheit durch verschiedene AMPK Kinasen phosphoryliert wird. Eine weitere Studie beschrieb verschiedene durch die Phosphorylierung der AMPK β vermittelte Regulationsmöglichkeiten der AMPK in Säugern (Warden *et al.*, 2001):

- 1) Durch die Phosphorylierung der β - Untereinheit wird deren Interaktion mit der α - und γ - Untereinheit reguliert.
- 2) Die Phosphorylierung der AMPK β steht im Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität der AMPK. Die Substitution der Aminosäure S108 der AMPK β 1 zu Alanin resultiert in einer starken Abnahme (~70%) der Enzymaktivität.
- 3) Die Phosphorylierung der AMPK β steht auch im Zusammenhang mit der subzellulären Lokalisierung der AMPK β . Die Substitution der Aminosäuren S24 und S25 und der Aminosäure S182 zu Alanin resultiert in einer erhöhten Lokalisierung der AMPK β im Nukleus.

Die Aminosäure S108 der hmAMPK β 2 ist in SPCC1919.03c (entspricht S130) konserviert. Allerdings wurde in der Studie von Warden *et al.* (2001) die Phosphorylierung der hmAMPK β 1 untersucht. Zwar wird postuliert, dass auch S108 der hmAMPK β 2 im Zusammenhang mit der funktionellen Aktivität der hmAMPK α steht, jedoch liegen keine Untersuchungen vor. Im Zuge dieser Arbeit konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass die β - Untereinheit SPCC1919.03c ähnlich wie in Säugern phosphoryliert vorliegt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dessen sind keine Rückschlüsse einer möglichen Regulation der AMPK durch die Phosphorylierung der AMPK β möglich.

Eine weitere posttranslationale Modifikation der AMPK β stellt die Myristylierung dar. In Säugern ist die AMPK β vollständig myristyliert, was zu einer Membranassoziation des AMPK - Komplexes führt (Mitchelhill *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde das Vorliegen einer möglichen myristylierten Form der β - Untereinheit in *S. pombe* nicht weiter untersucht.

4.2.2. Konservierung potentieller Phosphorylierungsstellen in Ssp2 und Ppk9

Der Existenznachweis von zwei verschiedenen AMPK - Komplexen in *S. pombe* ermöglichte nun die Identifizierung neuer Stimuli, die die Aktivität dieser Komplexe (AMPK I und AMPK II) modulieren. In Säugern wird unter ATP - Mangel AMPK α am T172 phosphoryliert, was wiederum zur Phosphorylierung des TSC2 - Proteins durch die AMPK führt (Inoki *et al.*, 2003a). In Folge dessen wird der TSC - Komplex in seiner Funktion als negativer Regulator des mTOR - Signalweges verstärkt. Die Phosphorylierung von AMPK α am T172 ist absolut notwendig für die funktionelle Aktivität der AMPK (Hawley *et al.*, 1996). Zwar konnten in *S. cerevisiae* keine homologen Gene zu den TSC - Genen aus Säugern identifiziert werden (s. 1.2), jedoch stellt auch hier die Phosphorylierung am konservierten T172 aus Säugern, welcher in *S. cerevisiae* T210 entspricht, ein notwendiges Ereignis der Aktivierung von Snf1 dar (Estruch *et al.*, 1992; McCartney and Schmidt, 2001). Ebenfalls in *S. pombe* liegt diese Phosphorylierungsstelle sowohl in der katalytischen α_1 - Untereinheit Ssp2 als auch in der α_2 - Untereinheit Ppk9 konserviert vor (Abb. 3.4). Das konservierte T172 entspricht in Ssp2 dem T189 und in Ppk9 dem T178. Die Mutation der Aminosäure T189 in Alanin von Ssp2 führt zum Phänotyp, den auch eine *ssp2 Δ* - Mutante zeigt (Abb. 3.9 D). Da das mutierte Ssp2^{T189A} - Protein stabil exprimiert wurde und damit der Phänotyp nicht auf eine erhöhte Degradation des mutierten Proteins zurückzuführen ist, scheint das T189 für die Funktion von Ssp2 essentiell zu sein. Ob T178 des Ppk9 - Proteins ebenfalls essentiell für die Funktion von Ppk9 ist, konnte aus Zeitgründen nicht mehr untersucht werden.

In Säugerzellen und *Drosophila* führt die Zugabe von 2-DOG zu einer zunehmenden Phosphorylierung der AMPK α am T172, was wiederum zur Aktivierung der AMPK führt (Jiang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Inoki *et al.*, 2003a; Pan and Hardie, 2002). Falls die AMPK α_1 in *S. pombe* ähnlich wie in Säugern reguliert wird, so sollte die Phosphorylierung am T189 des Ssp2 durch die Zugabe des toxischen Glukoseanalogons 2-DOG zunehmen. Jedoch führte die Inkubation der Zellkulturen mit 2-DOG zu einer massiven Lyse der Zellen, so dass eine Interpretation der erzielten Ergebnisse nicht möglich war.

Sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Säugern wird die AMPK α bei Glukosemangel phosphoryliert und aktiviert (Bertram *et al.*, 2002; McCartney and Schmidt, 2001; Wilson *et al.*, 1996; Jiang and Carlson, 1996; Woods *et al.*, 1994; Salt *et al.*, 1998). In Säugern konnte zudem gezeigt werden, dass die Aktivierung der AMPK α in einer erhöhten Translokation und einem erhöhten Proteinlevel an GLUT4 resultiert und so die Glukoseaufnahme stimuliert wird (Klip *et al.*, 2009; Chavez *et al.*, 2008; McGee *et al.*, 2008; Fryer *et al.*, 2002). Ebenso konnte eine Zunahme der Phosphorylierung von Hexosen durch die Aktivierung der AMPK α verzeichnet werden (Konrad *et al.*, 2005). In *S. cerevisiae* konnte zusätzlich eine Phosphorylierung von Snf1 nach eintretender Stickstofflimitation oder durch die Zugabe von Rapamycin nachgewiesen werden (Orlova *et al.*, 2006). Durch die gezeigte Konservierung des AMPK - Komplexes I und der Konservierung des Threoninrestes T172 in Ssp2 (T189) sollte untersucht werden, ob auch Ssp2 in Folge einer Nährstofflimitation phosphoryliert und

vermutlich dadurch aktiviert wird. In *S. pombe* führt Glukosemangel ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Phosphorylierung des T189 (Abb. 3.10). Im Gegensatz dazu konnte nur eine minimale Zunahme der am T189 phosphorylierten Form von Ssp2 unter Stickstoffhunger beobachtet werden.

Während in *S. cerevisiae* Snf1 für die diploide pseudohyphale Differenzierung (Kuchin *et al.*, 2002), die bei Stickstofflimitierung ausgelöst wird, notwendig ist, wird die pseudohyphale Differenzierung durch ScTORC1 negativ reguliert (Orlova *et al.*, 2006). In dieser Studie zeigte sich zudem, dass die Zugabe von Rapamycin, welche zu einer Inhibierung des ScTORC1 führt, in einer stark erhöhten Phosphorylierung des T210 von Snf1 resultierte. Dahingegen wiesen Zellen, welche ein Rapamycin-resistentes *TOR1* - Allel exprimieren, keine erhöhte Phosphorylierung des T210 auf. Daher wird spekuliert, dass Snf1 womöglich unterhalb des Rapamycin-sensitiven ScTORC1 agiert (Orlova *et al.*, 2006). Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung in tierischen Zellen, in denen die AMPK α den mTORC1 negativ reguliert (Gwinn *et al.*, 2008). Es stellt sich also die Frage, welcher Regulationsmechanismus der AMPK in *S. pombe* vorliegt. Mit Rapamycin-behandelte Zellen zeigten keine Zunahme der Phosphorylierung am T189 von Ssp2 (Abb. 3.11). Dies lässt vermuten, dass in *S. pombe* der AMPK-Komplex I nicht wie in *S. cerevisiae* durch den TORC1 negativ reguliert wird. Allerdings ist zu beachten, dass in *S. pombe* Rapamycin keinen Einfluss auf das vegetative Zellwachstum ausübt (Weisman *et al.*, 1997; Weisman *et al.*, 2001). Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in der Studie von Orlova *et al.* (2006) postulierte negative Regulation von Snf1 durch ScTORC1 auf einem Überexpressionsartefakt basiert.

Neben der beobachteten Zunahme der Phosphorylierung von Ssp2 am T189 in Antwort auf Stickstoff- und Glukoselimitation konnte ebenfalls eine Zunahme der Phosphorylierung in Abhängigkeit von der optischen Dichte beobachtet werden (Abb. 3.10). Eine Zunahme der optischen Dichte ging einher mit einer erhöhten T189 Phosphorylierung (ab $OD_{600} \sim 0,8$). Da die Glukosekonzentration bei Zunahme der optischen Dichte nicht abnahm und Stickstofflimitation nur zu einer schwachen Aktivierung der Ssp2 führt, scheint ein weiteres Salz / Spurenelement oder ein von *S. pombe* ausgeschiedenes Signalmolekül zu existieren, dass die Phosphorylierung und vermutlich die Aktivierung von Ssp2 beeinflusst. Nicht nur Bakterien, sondern auch zum Beispiel *C. albicans* und *S. cerevisiae* registrieren über das „Quorum sensing“ die Zelldichte ihrer Population (zur Übersicht: Hogan, 2006). Dabei wird die Zelldichte über kleine diffusionsfähige Moleküle und ihre Akkumulation in der extrazellulären Umgebung registriert. In *C. albicans* wurde Farnesol als „Quorum sensing“-Molekül identifiziert, welches nur in Abhängigkeit der Zelldichte synthetisiert und in die extrazelluläre Umgebung ausgeschieden wird (Hornby *et al.*, 2001; Oh *et al.*, 2001). Extrazellulär vorliegendes Farnesol übt keinen Einfluss auf die Wachstumsrate aus, jedoch wird das filamentöse Zellwachstum blockiert. In Folge dessen wird die Biofilmbildung beim Erreichen einer kritischen Zelldichte inhibiert (Ramage *et al.*, 2002). In *S. cerevisiae* wird postuliert, dass verschiedene Alkohole wie zum Beispiel Isoamylalkohol und Butanol das filamentöse Wachstum haploider Zellen stimulieren. Liegen ausreichend Nährstoffe vor, werden diese von den Hefezellen metabolisiert und die Konzentration

entstehender Nebenprodukte wie zum Beispiel Isoamylalkohol nimmt in der extrazellulären Umgebung zu. So besteht die Möglichkeit, dass *S. cerevisiae* die vorliegende Konzentration dieser Alkohole registriert, um über diese die Dichte der Zellpopulation zu messen, um entsprechend das Zellwachstum / -entwicklung anzupassen (Lorenz *et al.*, 2000). Kürzlich wurde postuliert, dass in *S. cerevisiae* während der exponentiellen Wachstumsphase die beiden ABC -Transporter Pdr5 und Snq2 ein unbekanntes Stoffwechselprodukt in die extrazelluläre Umgebung transportieren (Hlaváček *et al.*, 2009). Dieses akkumuliert während des Zellwachstums und fungiert als „Quorum sensing“ - Molekül, wenn die Zellkultur beispielsweise eine kritische Zelldichte erreicht hat. Dieses Signal wird von den Zellen gemessen und in Folge wird der Transkriptionsregulator Pdr1 degradiert (Hlaváček *et al.*, 2009). Pdr1 fungiert als Repressor einiger in der Diauxie - Phase induzierten Gene (Nawrocki *et al.*, 2001). Die fehlende Repression der in der Diauxie - Phase induzierten Gene könnte zu einer Veränderung des Metabolismus führen (Hlaváček *et al.*, 2009). Das Genom von *S. pombe* kodiert für zwei Homologe (Bfr1 und Pdr1) des ABC - Transporters Snq2 in *S. cerevisiae* (Iwaki *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde eine Lokalisation des Bfr1 - Proteins an der Zellperipherie, passend zu einer Lokalisierung in der Plasmamembran beschrieben (Iwaki *et al.*, 2006). Somit könnte ein ähnlicher Mechanismus wie für *S. cerevisiae* in *S. pombe* vorliegen. Jedoch liegen hierzu noch keine Daten vor. Dennoch könnte ein unbekanntes „Quorum sensing“ - Molekül in der Zelle die Phosphorylierung und vermutlich Aktivierung von Ssp2 veranlassen und beispielsweise den Eintritt in die stationäre Phase vermitteln. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die zunehmende Phosphorylierung am T189 von Ssp2 bei zunehmender Dichte.

Um erste Einblicke in die Funktion des Ppk9 - Proteins zu gewinnen, wurde die Änderung der Phosphorylierung des Ppk9 - Proteins in Abhängigkeit der optischen Dichte untersucht. Im Gegensatz zu Ssp2 konnte keine zunehmende Phosphorylierung des Ppk9 am T178 in Abhängigkeit der optischen Dichte beobachtet werden (Abb. 3.10).

4.2.3. Zusammensetzung des AMPK - Komplexes I bzw. des AMPK -Komplexes II in einer *ppk9Δ* - bzw. *ssp2* - Mutante in Antwort auf Stickstofflimitation

Das Vorliegen zweier AMPK - Komplexe in *S. pombe* wirft die Frage auf, ob beim Wegfall des einen AMPK - Komplexes, der zweite AMPK - Komplex die fehlende Funktion kompensieren kann oder ob AMPK I und AMPK II getrennte zelluläre Funktionen ausüben. Da unter Stickstoffhunger eine minimale Zunahme der Ssp2 - Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob Ppk9 das Ssp2 - Protein im AMPK - Komplex I ersetzen kann. Da jedoch unter Stickstoffhunger nicht mehr Ppk9 - Protein mit der β - oder γ - Untereinheit in einer *ssp2Δ* - Mutante präzipitiert werden konnte, scheint Ppk9 die Funktion des Ssp2 - Proteins im AMPK - Komplex I unter Stickstoffhunger nicht ersetzen zu können.

In der folgenden Abbildung sind die gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Konservierung der AMPK - Komplexe und ihrer möglichen Regulation in Antwort auf verschiedene Stress- / Hungerbedingungen dargestellt.

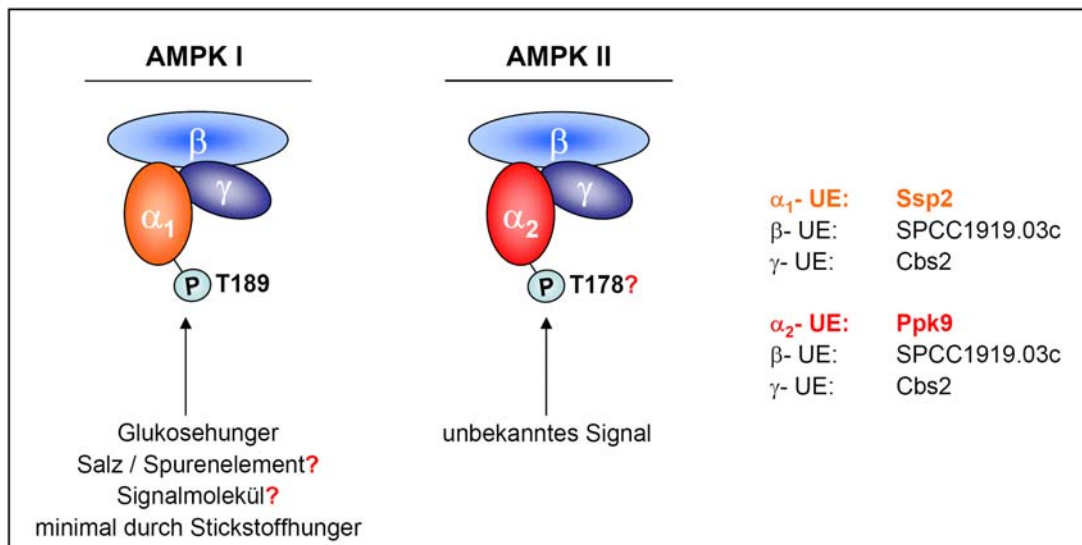


Abbildung 4.1: Modell und mögliche Regulationen der AMPK - Komplexe in *S. pombe*. Aufgrund von Ko-Immunpräzipitation - Experimenten konnte sowohl ein AMPK - Komplex I, bestehend aus der katalytischen Untereinheit Ssp2 und den regulatorischen Untereinheiten Cbs2 und SPCC1919.03c als auch ein AMPK - Komplex II, bestehend aus der katalytischen Untereinheit Ppk9 und den regulatorischen Untereinheiten Cbs2 und SPCC1919.03c nachgewiesen werden. Allerdings konnte die direkte Interaktion der potentiellen Untereinheiten untereinander nicht geklärt werden. Sowohl Ssp2 als auch Ppk9 werden, ähnlich wie in Säugern und *S. cerevisiae*, am konservierten Threonin phosphoryliert. Ssp2 wird in Antwort auf Glukosehunger, Stickstoffhunger und einem unbekanntem Salz / Spurenelement am T189 phosphoryliert. Dahingegen konnte für den AMPK - Komplex II noch kein Signal identifiziert werden, welches zu einer Phosphorylierung der α- Untereinheit Ppk9 führt.

4.2.4. Funktionelle Charakterisierung der potentiellen Untereinheiten der AMPK

Biochemische Daten zeigen, dass in *S. pombe* zwei AMPK - Komplexe existieren und der Phosphorylierungsrest T172 in Ssp2 und Ppk9 konserviert ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der optischen Dichte oder das Zellwachstum unter Glukose- / Stickstoffhunger zu einer Phosphorylierung von T172 in Ssp2 führt. Um weitere Einblicke in die Funktion von AMPK I und AMPK II zu erhalten, wurden im weiteren Verlauf Mutanten in den entsprechenden Untereinheiten des AMPK - Komplexes näher charakterisiert. Da es sich im Falle der AMP - aktivierten Proteinkinase um eine hochkonservierte Kinase handelt, bei der die Proteinsequenz von Ssp2 35% Identität zu hmAMPKα₁, 36 % Identität zu hmAMPKα₂ und 43 % Identität zu Snf1 in *S. cerevisiae* aufweist, ist es möglich Hinweise zu ihrer Funktion in *S. pombe* durch Daten aus anderen Organismen zu erhalten.

4.2.4.1. Funktionelle Charakterisierung der AMPKα₁ Ssp2

In einem ersten Ansatz wurde das für die katalytische Untereinheit kodierenden Gene *ssp2*⁺ deletiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Deletion des *ssp2*⁺ - Genes zeigte, dass dieses nicht essentiell in *S. pombe* ist (Abb. 3.12; Bimbó *et al.*, 2005). Zur phänotypischen Analyse der *ssp2*⁺ - Deletionsmutante wurden zunächst Substanzen getestet, von denen bekannt ist, dass sie bei Mutanten

im TOR - Signalweg einen Wachstumsphänotyp hervorrufen (Abb. 3.12). Dadurch sollten erste Hinweise auf eine mögliche Funktion der AMPK - Komplexe im TOR - Signalweg in *S. pombe* erzielt werden. Die Deletion von *ssp2⁺* und der für die regulatorischen Untereinheiten kodierenden Gene resultiert in einer Hypersensitivität gegenüber Ethionin und Canavanin. Im Gegensatz dazu resultiert eine Deletion von *tsc1⁺* und / oder *tsc2⁺*, deren Genprodukte den TOR - vermittelten Signalweg über die GTPase Rhb1 negativ regulieren, in einer Resistenz gegenüber diesen Substanzen (van Slegtenhorst *et al.*, 2004; van Slegtenhorst *et al.*, 2005; persönliche Mitteilung, A. Dierkes). Dieses gegensätzliche phänotypische Verhalten der *ssp2Δ* - Mutante zu jeweils den *tsc1⁺* - / *tsc2⁺* - Deletionsmutanten suggeriert, dass die Tsc - Proteine und Ssp2 antagonistische Funktionen ausüben und womöglich, ähnlich wie in Säugern und *Drosophila* beschrieben, im TOR - Signalweg agieren.

In *S. pombe* wird die Argininaufnahme durch den TSC - Komplex positiv, durch Rhb1 und Tor2 negativ reguliert (Uritani *et al.*, 2006; van Slegtenhorst *et al.*, 2004). In der Annahme einer positiven Regulation der Aminosäureaufnahme durch Ssp2 könnte Ssp2 oberhalb des TSC - Komplexes agieren und es wäre eine Resistenz gegenüber Ethionin und Canavanin zu erwarten. Die jedoch beobachtete Sensitivität gegenüber Ethionin und Canavanin in einer *ssp2Δ* - Mutante, würde eine negative Regulation der Aminosäureaufnahme, ähnlich wie die durch Rhb1 / Tor2 bedeuten. In Folge dessen würde Ssp2 anders als in Säugern die AMPK, als negativer Regulator des TSC - Komplexes agieren. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Sensitivität gegenüber Ethionin und Canavanin in einer *ssp2Δ* - Mutante nicht in einer Hyperaktivierung der Aminosäureaufnahme begründet zu liegen scheint. Die Messung der Argininaufnahme mittels radioaktiv markierten Arginin unterstützt diese Annahme (Abb. 3.17). Im Vergleich zum Wildtyp konnte keine erhöhte Aufnahme der Aminosäure Arginin in einer *ssp2⁺* - Deletionsmutante verzeichnet werden. Die in den *tscΔ* - Mutanten vermittelte Resistenz gegenüber den toxischen Aminosäuren beruht zum einen auf der Fehllokalisierung der Aminosäurepermease SPB359.03c und Cat1 (Matsumoto *et al.*, 2002; Aspuria and Tamanoi, 2008). Jedoch erscheint die Fehllokalisierung der Aminosäurepermease SPB359.03c in den *tscΔ* - Mutanten eher fraglich, da in der Diplomarbeit von N. Saal (2005) die Deletion des *SPB359.03c⁺* in keiner Canavanin - Resistenz resultierte. Dahingegen führte die Deletion von *cat1⁺* zu einer Canavanin - Resistenz (N. Saal, 2005). Diese Beobachtung unterstützt die Vermutung von Aspuria and Tamanoi (2008), dass die in der *tsc2Δ* - Mutante gezeigte Canavanin - Resistenz auf der Fehllokalisierung der Aminosäurepermease Cat1 zu basieren scheint.

Wird Canavanin in die Zelle aufgenommen, beruht die Giftwirkung von Canavanin auf der Konkurrenz mit der essentiellen Aminosäure Arginin. In Folge wird Canavanin in entstehende Aminosäureketten eingebaut, welches letztendlich zu einer inkorrekten Proteinfaltung und somit zum Funktionsverlust des Proteins führt (Rosenthal, 1977). So konnte zum Beispiel in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass eine Inkubation der Zellen mit Canavanin zu einer Bildung fehlgefalteter Proteine *in vivo* führt (Seufert and Jentsch, 1990). Dadurch wäre ein Defekt im Abbau falschgefalteter Proteine in einer *ssp2Δ* - Mutante denkbar, resultierend in einer Hypersensitivität gegenüber diesem toxischen

Aminosäureanalogon. Mittels „Westernblot“-Analysen konnten Kog1, Mip1, Pfk1 (persönliche Mitteilung, G. von Coelln) und Tsc2 (Daten nicht gezeigt) in einer *ssp2Δ*-Mutante nicht mehr nachgewiesen werden. Dies würde einem Defekt im Proteinabbau widersprechen, da aufgrund dieser Beobachtung eine Überaktivität in der Degradation von Proteinen vorliegen würde. Zur Aufklärung, ob in einer *ssp2Δ*-Mutante ein veränderter Proteinabbau vorliegt sind weiterführende Studien notwendig. In einem ersten Ansatz müsste die postulierte fehlende oder überaktive Proteindegradation zum Beispiel mittels radioaktiv markierten Methionin in einer *ssp2Δ*-Mutante bestimmt werden.

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein resistentes Wachstumsverhalten einer *ssp2Δ*-Mutante gegenüber Cadmium nachgewiesen werden (Abb. 3.12). In einer genomweiten Suche nach Genen, welche in die Toleranz gegenüber Cadmium involviert sind, konnte *ssp2⁺* nicht identifiziert werden (Kennedy *et al.*, 2008). Jedoch wurde in dieser Studie nur nach Cadmium-sensitiven Mutanten gesucht. Dies erklärt die fehlende Identifizierung von Ssp2.

Eine wichtige Komponente in der Detoxifikation von Cadmium stellt der Transkriptionsfaktor Zip1 dar. Unter Normalbedingungen wird dieser polyubiquitiniert und über die SCF^{Pof1} degradiert (Harrison *et al.*, 2005). Cadmiumstress löst in der Zelle sowohl eine erhöhte Expression von *zip1⁺* als auch eine Verstärkung der Aktivität des Transkriptionsfaktors Zip1 aus (Harrison *et al.*, 2005). Dies resultiert in einer erhöhten Synthese von Glutathion und Polychelatine, welche Cadmium binden. In Folge wird das an Glutathion oder Polychelatin gebundene Cadmium über den ABC-Transporter Hmt1 (heavy metal tolerance factor 1) in die Vakuole transportiert (Prévéral *et al.*, 2009). Basierend auf dem vermuteten Defekt im Proteinabbau der *ssp2Δ*-Mutante besteht die Möglichkeit, dass in einer *ssp2Δ*-Mutante die schwache Resistenz gegenüber Cadmium vermutlich durch die nicht vorliegende Degradation des Transkriptionsfaktor Zip1 gegeben sein könnte.

Das potentielle AMPK α -Homolog Ssp2 scheint in einer Vielzahl zellulärer Prozesse involviert zu sein. Ausgehend von der Beobachtung eines temperatursensitiven Verhaltens der *ssp2⁺*-Deletionsmutante, welches durch die Zugabe von Sorbitol aufgehoben werden konnte, könnte Ssp2 in die Regulation der Zellwandbiogenese involviert sein. Dies wurde auch für eine *pmk1Δ*-Mutante beschrieben (Toda *et al.*, 1996). In *S. pombe* stellt die MAPK Pmk1 einen wichtigen Teil des Zellintegritäts-Signaltransduktionsweges dar (Barba *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2006). Eine Deletion von *pmk1⁺* resultiert in einer Temperatur- und KCl-Sensitivität und in einer Resistenz gegenüber NaCl (Madrid *et al.*, 2006). Die beobachtete Resistenz gegenüber NaCl, die Sensitivität gegenüber KCl und erhöhter Temperatur konnte ebenfalls für die *ssp2Δ*-Mutante gezeigt werden (Abb. 3.12). Zudem wird die Involvierung von Ssp2 in der Zellwandbiogenese durch die beobachtete Hypersensitivität einer *ssp2Δ*-Mutante gegenüber 2-DOG, welche ebenfalls durch die Zugabe von Sorbitol supprimiert werden konnte, gestützt. Wie unter 4.1 diskutiert, führt die Zugabe von 2-DOG zu einer Lyse der Zellen. Sorbitol selbst führt bei Zellen zu osmotischem Stress, der über den Sty1/Spc1-Signalweg verarbeitet wird (Madrid *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2002). Somit besteht auch

die Möglichkeit, dass die Suppression der hier beschriebenen Wachstumsdefekte nicht durch die Suppression von Zellwanddefekten durch Sorbitol zustande kommt. Eine Aktivierung des Sty1 /Spcl - Signalweges durch Sorbitol könnte ebenfalls zu einer Kompensation der Sensitivität gegenüber 2-DOG und des temperatursensitiven Wachstumsverhaltens führen. Mutanten, die einen Defekt in der Zellwandintegrität aufweisen, zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine Sensitivität gegenüber Zymolyase. Um die Annahme eines Defektes in der Zellwandbiogenese zu verifizieren, wurde die *ssp2Δ* - Mutante auf ihr Verhalten gegenüber Zymolyase getestet. Jedoch führte eine Inkubation mit Zymolyase zu keinem Unterschied in der optischen Dichte, welche als Maß der Zellwandlyse verwendet wurde (Abb. 3.13). Ausgehend von dieser Beobachtung scheint Ssp2 nicht an der Regulation der Zellwandbiogenese beteiligt zu sein. Die Suppression durch Sorbitol ist vermutlich auf die Aktivierung des Sty1 /Spcl - Signalweges zurückzuführen. Zur Verifizierung dieser Annahme, könnte die Überexpression von *sty1*⁺ in der *ssp2Δ* - Mutante bei erhöhter Temperatur und in der Anwesenheit von 2-DOG weitere Hinweise liefern.

Da Ssp2 nicht an der Regulation der Zellwandbiogenese beteiligt zu sein scheint, könnte die durch eine *ssp2*⁺ - Deletion vermittelte Resistenz gegenüber NaCl und die Sensitivität gegenüber KCl auf einer Beteiligung von Ssp2 in der Regulation der Kaliumtransporter im Falle der Osmoadaption begründet liegen. Eine Deletion von *ssp2*⁺ könnte somit zu einer erhöhten Expression oder zu einer erhöhten Rekrutierung von Kaliumtransportern an die Plasmamembran führen. Dies würde in der Anwesenheit von NaCl zu einer erhöhten Aufnahme von Kaliumionen und in Folge zu einer verstärkten ersten Antwort auf osmotischen Stress, resultierend in der Resistenz gegenüber NaCl, führen. In *S. pombe* stellen Trk1 und Trk2 das Haupttransportsystem von Kalium dar (Calero *et al.*, 2000; Lichtenberg-Fraté *et al.*, 1996; Soldatenkov *et al.*, 1995). Die Deletion der für die Kaliumtransporter - kodierenden Gene *trk1*⁺ und / oder *trk2*⁺ führt zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Na⁺, vermutlich durch die erhöhte Aufnahme von Kalium (Calero *et al.*, 2004). In Folge dessen könnte die NaCl - Resistenz der *ssp2Δ* - Mutante durch die erhöhte Expression des Kaliumtransporters Trk1 gegeben sein. Die durch die *ssp2*⁺ - Deletion vermittelte Sensitivität gegenüber KCl könnte so auf der erhöhten Aufnahme der Kaliumionen basieren.

Im Zuge dieser Arbeit und parallel laufender Versuche stellte sich heraus, dass der Verlust der Ssp2 - Funktion zu einem Defekt in der Konjugation und sexuellen Differenzierung in Antwort auf Stickstoffhunger führt (Abb. 3.18; persönliche Mitteilung, A. Lorberg). Da der Verlust der sexuellen Differenzierung ausgelöst durch Stickstoffhunger ebenfalls in verschiedenen TOR - Signalweg - Mutanten beschrieben wurde, lag die Untersuchung der Expression verschiedener durch Stickstoffhunger - induzierter Gene nahe. Dabei lag der Fokus auf Genen, bei denen ein verändertes Expressionsmuster in den verschiedenen TOR - Signalweg - Mutanten bereits beschrieben wurde. So konnte gezeigt werden, dass sowohl Rhb1 als auch Tor2 die Expression der durch Stickstoffhunger - induzierten Gene *fnx1*⁺ (Matsuo *et al.*, 2007; Tabancay *et al.*, 2003; Mach *et al.*, 2000) und *stel1*⁺ negativ regulieren (Alvarez and Moreno, 2006). In einer *tor1Δ* - Mutante konnte zwar kein verändertes

Expressionsmuster von *ste11*⁺ nachgewiesen werden, jedoch führte eine Überexpression von *ste11*⁺ in der *tor1Δ* - Mutante zu einer schwachen Suppression des Paarungsdefektes der *tor1Δ* - Mutante (Kawai *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu wies eine *ssp2Δ* - Mutante das gleiche bzw. ähnliche Expressionsmuster wie der Wildtyp auf. So führte Stickstofflimitation in einer *ssp2Δ* - Mutante nur zu einer minimal verringerten Expression des *ste11*⁺ - Genes und zu keiner Änderung der Expression des durch Stickstoffhunger - induzierten Genes *fnx1*⁺ (Abb. 3.19; Daten nicht gezeigt). Da die Expression der Gene *ste11*⁺ und *fnx1*⁺ in der *ssp2Δ* - Mutante durch Stickstoffhunger induziert wird, ist die *ssp2Δ* - Mutante vermutlich noch in der Lage, die An- / Abwesenheit von Stickstoff im Medium zu registrieren. Somit scheint der Paarungsdefekt der *ssp2Δ* - Mutante in einem späteren Schritt der sexuellen Differenzierung begründet zu liegen. Im Gegensatz dazu konnte in den *tscΔ* - Mutanten keine Induktion des Transkriptionsfaktors *ste11*⁺ verzeichnet werden, sodass hier der Paarungsdefekt vermutlich in der frühen Phase der sexuellen Differenzierung, d.h. in der Signalwahrnehmung oder -weiterleitung begründet zu liegen scheint. Dies wird weiterhin durch die Expression der durch Stickstoffhunger - induzierten Gene *isp5*⁺ und *isp4*⁺ bestärkt. So wies eine *ssp2Δ* - Mutante nach eintretender Stickstofflimitation das gleiche Expressionsmuster von *isp4*⁺ und nur eine minimal verringerte Expression von *isp5*⁺ im Vergleich zum Wildtyp auf. Im Gegensatz dazu führte eine Deletion des *tsc1*⁺ und *tsc2*⁺ - Genes zu einer verminderten Expression der Gene *isp5*⁺ und *isp4*⁺ (Abb. 3.19).

In *S. pombe* führt eine eintretende Stickstofflimitierung zu einer Abnahme des intrazellulären cAMP - Spiegels und vermittelt die sexuelle Entwicklung. Es konnte auch gezeigt werden, dass Kohlenstoffhunger, ähnlich wie Stickstoffmangel, über einen cAMP - abhängigen Mechanismus zu einer verstärkten sexuellen Entwicklung führt (Mochizuki and Yamamoto, 1992). So könnte der Verlust der sexuellen Differenzierung der *ssp2Δ* - Mutante in der fehlenden Expression der durch Glukosehunger - induzierten Gene liegen, die auch erforderlich für die Regulation der sexuellen Differenzierung über die cAMP - Signalkaskade notwendig sind, begründet liegen. Dies wäre eine Erklärung für die minimale Aktivierung von Ssp2 unter Stickstoffhunger ebenso wie die fast unveränderte Expression Stickstoff - abhängiger Gene (Abb. 3.10). Um zu klären, ob der Verlust der sexuellen Differenzierung einer *ssp2Δ* - Mutante in der fehlenden Adaption an Glukoselimitation begründet liegt, müsste untersucht werden, ob die Deletion des *ssp2*⁺ - Genes einen Effekt auf die Expression der durch Glukosehunger - induzierten Gene ausübt. Im Gegensatz zu der *ssp2Δ* - Mutante weisen die *tsc* - Mutanten einen nicht so stark ausgeprägten Defekt in der sexuellen Differenzierung auf (persönliche Mitteilung, A. Lorberg). In einer *tor2*⁺ - inaktiven Mutante konnte keine Veränderung des Transkriptionsniveaus der Gene, welche unter Glukosehunger exprimiert werden, festgestellt werden (Matsuo *et al.*, 2007). Die *tor2*⁺ - inaktive Mutante zeigt eine verstärkte Expression der durch Stickstoffhunger - induzierten Gene auf, sodass hier der Defekt in der sexuellen Differenzierung alleinig in der fehlenden Antwort auf Stickstoffmangel liegt. Da sowohl Stickstoff- als auch Glukoselimitation zur Induzierung der sexuellen Differenzierung führen, lässt sich vermuten, dass der

stärker ausgeprägte Defekt in der sexuellen Differenzierung der *ssp2Δ* - Mutante in der Addition der Glukose- und Stickstofflimitation zu liegen scheint.

In der durchgeführten Analyse zur Bestimmung der Paarungseffizienz wurde mittels Jodfärbung, die sich in den Sporen akkumulierende amyloseähnliche Substanz angefärbt. Dabei konnte für die *ssp2Δ* - Mutante keine Akkumulation dieser amyloseähnlichen Substanz nachgewiesen werden. In *S. cerevisiae* bewirkt eine Nährstofflimitation die Akkumulation von Glykogen, während der Meiose (Colonna *et al.*, 1978). Die Deletion von *SNF1* führt jedoch nur zu einer transienten Akkumulation von Glykogen (Wang *et al.*, 2001). Dies impliziert eine Snf1 - abhängige Regulation der Glykogenakkumulation unter nährstoffarmen Bedingungen. Mutanten, welche nicht mehr in der Lage sind, Glykogen zu synthetisieren, weisen einen Defekt in der Sporulation auf (Cannon *et al.*, 1994). Ebenso konnte für die *snf1Δ* - Mutante der Verlust der Sporulationsfähigkeit in Sporulationsmedium gezeigt werden (Honigberg and Lee, 1998). Aufgrund dieser Beobachtungen besteht die Möglichkeit, dass in *S. pombe* der Paarungsdefekt der *ssp2Δ* - Mutante in einem Verlust der Bildung der amyloseähnlichen Substanz und in Folge dessen in der Unfähigkeit zu sporulieren, begründet liegt.

4.2.4.2. Funktionelle Charakterisierung der AMPK α_2 Ppk9

In Abhängigkeit der optischen Dichte konnte eine Zunahme des phosphorylierten Ssp2 - Proteins, hingegen keine Änderung der Phosphorylierung des Ppk9 - Proteins verzeichnet werden. Zudem wurde in *S. pombe* das Vorkommen zweier AMPK - Komplexe demonstriert. Dies wirft die Frage über mögliche getrennte zelluläre Funktionen dieser Isoformen auf. Im Gegensatz zu der *ssp2⁺* - Deletionsmutante resultierte die Deletion des *ppk9⁺* - Genes in einer sehr schwachen Resistenz gegenüber dem toxischen Aminosäureanalogon Canavanin und in einer Sensitivität gegenüber Cadmium unter den getesteten Stressbedingungen (Abb. 3.12). In der Studie von Kennedy *et al.* (2008) konnte *ppk9⁺* jedoch nicht als Gen identifiziert werden, welches in die Toleranz gegenüber Cadmium involviert ist. In dieser Studie wurden verschiedene Deletionsmutanten auf ihr Wachstumsverhalten in Anwesenheit von 100 μ M Cadmium untersucht. Im Gegensatz dazu wurde in der hier durchgeführten Wachstumsanalyse eine Cadmium - Konzentration von 500 μ M eingesetzt. Wie unter 4.2.4.1 beschrieben, resultiert Cadmiumstress in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Zip1. Des Weiteren wird postuliert, dass die Aktivierung von Zip1 über dessen Phosphorylierung veranlasst wird (Harrison *et al.*, 2005). Da eine Deletion des *zip1⁺* - Genes analog zu der *ppk9Δ* - Mutante in einer Sensitivität gegenüber Cadmium resultiert (Harrison *et al.*, 2005), ist es vorstellbar, dass Ppk9 Zip1 phosphoryliert. In Folge wird die Adaption durch die Expression der für die Detoxifikation des Cadmiums benötigten Gene durch Zip1 induziert. In einer *ppk9Δ* - Mutante würde dann die Expression der Gene, welche beispielsweise für den putativen Sulfattransporter SPAC869.05c oder für die putative Cystathion γ - Synthase SPAC23A1.14c kodieren, fehlen.

Eine weitere funktionelle Trennung der beiden Isoformen der AMPK α scheint in der sexuellen Differenzierung vorzuliegen. Im Gegensatz zu der *ssp2 Δ* - Mutante weist eine *ppk9 Δ* - Mutante keinen Defekt in der sexuellen Differenzierung auf.

Eine gleichzeitige Deletion von *ssp2⁺* und *ppk9⁺* zeigt keinen letalen Phänotyp. Im Zuge der phänotypischen Charakterisierung fiel allerdings auf, dass der Phänotyp einer *ssp2 Δ* - Mutante unter all den getesteten Stressbedingungen dominierte. Somit scheint tatsächlich nur Ssp2 in die Verwertung nicht - fermentierbarer Kohlenstoffquellen, in die Antwort bei erhöhter Temperatur (37°C) und osmotischen Stress sowie in die Regulation der sexuellen Differenzierung involviert zu sein. Eine ähnliche funktionelle Trennung der AMPK α - Isoformen konnte auch in Säugern beobachtet werden. Menschliche RPE - Zellen (retinale Pigmentepithelien) exprimieren sowohl eine α_1 - als auch eine α_2 - Untereinheit. Bei oxidativem Stress stellt zwar die α_1 -Untereinheit die stärker am T172 phosphorylierte Isoform dar, jedoch vermittelte die α_2 - Untereinheit die stärkere Inhibierung der Zellphagozytose in den retinalen Pigmentepithelien (Qin and de Vries, 2008). Der „knock-out“ der AMPK α_2 führte zu einer Reduzierung der durch oxidativen Stress vermittelten Zellphagozytose in den retinalen Pigmentepithelien. Diese ist assoziiert mit einer dramatischen Abnahme des durch AMPK α_2 -induzierten ACC - Signalweges (ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase) in Antwort auf oxidativen Stress. Ausgehend von der Beteiligung der humanen AMPK α_2 an der Adaption an oxidativen Stress wurde in dieser Arbeit das phänotypische Verhalten einer *ppk9⁺* - Deletionsmutante auf Wasserstoffperoxid (H₂O₂) untersucht. Jedoch konnte für die *ppk9 Δ* - Mutante keine Sensitivität gegenüber H₂O₂ gezeigt werden. Obwohl für die *ppk9 Δ* - Mutante eine Sensitivität gegenüber dem Mikrotubuli - Destabilisator Thiabendazol (TBZ) beschrieben wurde (Bimbó *et al.*, 2005), konnte dies in der phänotypischen Charakterisierung hier nicht bestätigt werden (Abb. 3.12). Vergleicht man das Wachstum der *ppk9 Δ* - Mutante in der Abwesenheit von TBZ mit dem in der Anwesenheit von TBZ, ist in der Studie von Bimbó *et al.* (2005) jedoch kein signifikanter Unterschied im Wachstumsverhalten zu verzeichnen und lässt die publizierte TBZ - Sensitivität fraglich erscheinen.

4.2.4.3. Funktionelle Charakterisierung der AMPK β SPCC1919.03c und der AMPK γ Cbs2

Interessanterweise wiesen die Deletionsmutanten der β - bzw. der γ - Untereinheit unter allen getesteten Wachstumsbedingungen (mit Ausnahme 2-DOG und Hitzestress) das gleiche Wachstumsverhalten wie eine *ssp2 Δ* - Mutante auf (Abb. 3.12). Diese genetischen Daten stützen die biochemischen Daten, dass Ssp2, Cbs2 und SPCC1919.03c einen Komplex bilden. In Anwesenheit 2-DOG und während des Zellwachstums bei 37°C scheint Ssp2 in Abwesenheit der regulatorischen Untereinheiten noch eine geringe Restaktivität aufzuweisen. Die Zugabe von 2-DOG und die Inkubation der *cbs2 Δ* - bzw. *SPCC1919.03c Δ* - Mutante bei 37 °C resultierte in einer nicht so stark ausgeprägten Sensitivität im Vergleich zu der *ssp2 Δ* - Mutante. In Säugern führt die Abwesenheit der AMPK β und AMPK γ ebenfalls zu einer minimalen Restaktivität von AMPK α (Crute *et al.*, 1998). Dementsprechend wäre

ebenfalls in *S. pombe* eine Adaption an 2-DOG und an eine erhöhte Wachstumstemperatur unabhängig von den regulatorischen Untereinheiten durchaus möglich.

4.2.5. Komplementationsanalyse von *S. cerevisiae* - und *S. pombe* - Stämmen mit fehlender AMPK α - Untereinheit

Die Proteinsequenz von Ssp2 weist 43 % Identität zu der katalytischen Untereinheit Snf1 in *S. cerevisiae* auf. Ähnlich wie Ssp2 ist Snf1 essentiell für die Adaption der Hefezellen an glukoselimitierenden Bedingungen, für die Verwertung von alternativen (Sucrose) und nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Celenza *et al.*, 1986). Ebenso ist bekannt, dass Snf1 in die Adaption an eine Vielzahl verschiedener Stresssituationen außer dem Glukosehunger involviert ist. So konnte eine durch die Deletion von *SNF1* vermittelte Sensitivität gegenüber NaCl, Hitzeschock (50°C) als auch bei alkalischem Stress nachgewiesen werden (Ye *et al.*, 2008; Hong and Carlson, 2007; Platara *et al.*, 2006; McCartney and Schmidt, 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen besteht die Möglichkeit, dass Snf1 in der Lage ist, die durch die *ssp2* Δ -Deletion vermittelten Wachstumsphänotypen zu komplementieren. Im Gegensatz zu der katalytischen Untereinheit Ssp2 in *S. pombe* resultiert eine Deletion von *SNF1* in *S. cerevisiae* in einer Sensitivität gegenüber NaCl (Ye *et al.*, 2008; Hong and Carlson, 2007). Während eine *ssp2* Δ -Mutante bei 37 °C nur noch minimales Wachstum zeigt, weist eine *snf1* Δ -Mutante erst bei 50 °C einen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp auf (Hong and Carlson, 2007; Thompson-Jaeger *et al.*, 1991). Trotz der Unterschiede im phänotypischen Verhalten von *S. cerevisiae snf1* Δ und *S. pombe ssp2* Δ konnte eine Suppression der für die *ssp2* Δ -Mutante beschriebenen Phänotypen durch die heterologe Expression von *SNF1* in einer *ssp2* Δ -Mutante sowohl in der Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen als auch bei erhöhter Temperatur (37°C), gegenüber 2-DOG, Canavanin und NaCl demonstriert werden (Abb. 3.15). Allerdings führte die Expression von *ssp2*⁺ in einer *snf1* Δ -Mutante nicht zu einer Suppression der Wachstumsdefekte bei niedrigen Glukosekonzentrationen im Medium oder in der Anwesenheit von alternativen Kohlenstoffquellen (Abb. 3.14). In Folge dessen ist Ssp2 nicht in der Lage, das Snf1-Protein in *S. cerevisiae* zu ersetzen. Dies könnte darin begründet liegen, dass das *ssp2*⁺-Gen noch Introns beinhaltet und diese bei der heterologen Expression in *S. cerevisiae* nicht korrekt gespleißt werden. In Folge dessen wird kein funktionelles Ssp2 translatiert. Um dies näher zu untersuchen, müsste die Komplementationsanalyse mit *ssp2*⁺ cDNA, die keine Introns mehr enthält, in einer *snf1* Δ -Mutante durchgeführt werden. Da die Proteinsequenz von Ppk9 30 % Identität zu der katalytischen Untereinheit Snf1 in *S. cerevisiae* aufweist, besteht ebenso die Möglichkeit, dass trotz der teilweise ähnlichen Phänotypen der *ssp2* Δ und *snf1* Δ -Mutante nur die AMPK α_2 -Untereinheit Ppk9 aus *S. pombe* in der Lage ist, das Snf1-Protein in *S. cerevisiae* zu ersetzen. Dies konnte jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

4.3. Die Einordnung von Ssp2 innerhalb des TOR - Signalweges

Da sich eine *ssp2*⁺ - Deletionsmutante gegensätzlich zu den *tsc* - Deletionsmutanten verhält, kann man vermuten, dass die TSC - Proteine und Ssp2 antagonistische Funktionen ausüben. Zum anderen führte eine Analyse der in der Protozoe *Encephalitozoon cuniculi* vorkommenden Kinasen zu einer ungewöhnlichen Erkenntnis (Miranda-Saavedra *et al.*, 2007). Obwohl in vorangegangenen Studien ein universelles Vorkommen von TOR und AMPK α - Homologen in Eukaryoten beschrieben wurde, kodiert das Genom dieses Protozoen für keines dieser Homologe. Dies könnte bedeuten, dass AMPK α und TOR Mitglieder eines gleichen Signalweges sind, der in *E. cuniculi* fehlt. Ob die AMPK und der TSC - Komplex am gleichen Signalweg beteiligt sind, sollte durch verschiedene genetische Untersuchungen aufgeschlüsselt werden. Eine zusätzliche Deletion des *tsc1*⁺ - und / oder des *tsc2*⁺ - Gens in der *ssp2* Δ - Mutante resultiert in dem gleichen phänotypischen Verhalten wie eine *tsc* Δ - Mutante in der Anwesenheit von Canavanin oder Ethionin (Abb. 3.16 A). Dementsprechend führt eine Hyperaktivierung des TSC / Rhb1 - Signalweges, ausgelöst durch die fehlende Funktion des TSC - Komplexes, zu einer Suppression der Wachstumsdefekte gegenüber Canavanin oder Ethionin in der *ssp2* Δ - Mutante. Eine Überexpression von *rhb1*⁺ in der *ssp2* Δ - Mutante führt ebenfalls zu einer Suppression der Wachstumsdefekte. Die *tsc* Δ - Mutanten weisen einen Aufnahmedefekt von Aminosäuren wie zum Beispiel Arginin auf (van Slegtenhorst *et al.*, 2004) und eine Hyperaktivierung der GTPase Rhb1 resultiert in dem gleichen Phänotyp wie die *tsc* Δ - Mutanten (Urano *et al.*, 2005). Wie bereits unter 4.2.4.1 diskutiert, ist die durch eine *ssp2*⁺ - Deletion vermittelte Sensitivität gegenüber Canavanin nicht wie erwartet, in einer erhöhten Argininaufnahme begründet. Somit scheint die Suppression der Sensitivität gegenüber Canavanin auf dem Defekt in der Argininaufnahme der *tsc*⁺ - Mutanten zu basieren. Die durch die Hyperaktivierung von Rhb1 vermittelte Suppression der Canavanin - Sensitivität in der *ssp2* Δ - Mutante scheint daher in der erhöhten Reprimierung der Aminosäuretransportersynthese begründet zu liegen (Uritani *et al.*, 2006; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2002; Aspuria and Tamanoi, 2008; van Slegtenhorst *et al.*, 2004). Die verminderte Argininaufnahme in einer *tsc1* Δ *ssp2* Δ - Mutante belegt diese Annahme (Abb. 3.17). Dies lässt vermuten, dass Ssp2 und der TSC - Komplex in zwei parallelen Signalwegen agieren. Ebenso besteht die Möglichkeit einer Regulation des SpTORC1 durch Ssp2, ähnlich wie in Säugern beschrieben (Gwinn *et al.*, 2008). Die Überprüfung des parallelen Vorkommens der Ssp2 - Funktion und des TSC / TOR - Signalweges in Anwesenheit der toxischen Aminosäureanaloga für Arginin und Methionin führte zu einem unerwarteten Ergebnis. Obwohl in bereits publizierten Studien eine Canavanin - Resistenz, ausgelöst durch die Überexpression von *tor2*⁺ beschrieben wurde (Weisman *et al.*, 2007), resultiert das Abschalten von Tor2 (*tor2*^{ts}) in einer leichten Resistenz gegenüber Canavanin (20 μ g/ml). Höhere Konzentrationen an Canavanin im Medium (70 μ g/ml) verstärkte die Resistenz der *tor2*^{ts} - Mutante (G. von Coelln, persönliche Mitteilung). Der Verlust der Tor2 - Aktivität geht einher mit einem Phänotyp gleich einer Stickstofflimitierung und in Folge mit einer erhöhten Aminosäureaufnahme (Weisman *et al.*, 2007; Álvarez and Moreno, 2006; Nakase *et al.*, 2006; van

Slegtenhorst *et al.*, 2004). Eine hyperaktive Form von *rhb1*⁺ weist den gleichen Phänotyp wie *tsc*-Mutanten auf, hingegen eine inaktive Form von *rhb1*⁺ eine Hypersensitivität gegenüber Canavanin und eine erhöhte Aufnahme von Arginin (Nakase *et al.*, 2006; Urano *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2001). Somit fällt es schwer, die durch eine *tor2*^{ts}-vermittelte Resistenz gegenüber Canavanin oder Ethionin einzuordnen. Es wurde zwar gezeigt, dass die Inkubation der *tor2*^{ts}-Mutante bei ihrer restriktiven Temperatur in Vollmedium in einer sexuellen Differenzierung, ähnlich einer Stickstofflimitierung führt, jedoch wurden keine Untersuchungen zur Auswirkung des temperatursensitiven Allels in Antwort auf verschiedene Stressbedingungen durchgeführt (Álvarez and Moreno, 2006). Dadurch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das temperatursensitive *tor2-51*-Allel zu einer Hyperaktivierung von Tor2 gegenüber den toxischen Aminosäureanaloga Canavanin und Ethionin führt. Im Falle einer Hyperaktivierung von Tor2 wäre dies eine Erklärung für die beschriebene Resistenz gegenüber Canavanin und Ethionin. Die Untersuchung der sexuellen Differenzierung der *tor2*^{ts} während der permissiven Temperatur zeigte keinen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp, so dass bei 25 °C das Genprodukt des *tor2*^{ts}-Allels voll funktionsfähig in Bezug auf die sexuelle Differenzierung vorliegt (Álvarez and Moreno, 2006). In Folge sollten unter permissiven Bedingungen keine Phänotypen der *tor2*^{ts}-Mutante zu beobachten sein. Jedoch waren schon unter den permissiven Bedingungen die beschriebenen Resistenzen einer *tor2*^{ts}-Mutante zu verzeichnen. Dies lässt vermuten, dass tatsächlich eine Hyperaktivierung von Tor2 vorliegen könnte. Da nicht geklärt ist, ob bei der verwendeten *tor2*^{ts}-Mutante eine Hyperaktivierung oder ein Funktionsverlust während der restriktiven Temperatur gegenüber Canavanin und Ethionin vorliegt, werden im Folgenden beide Möglichkeiten zur Einordnung der Ssp2-Funktion in den TOR-Signalweg diskutiert. Dabei ist festzuhalten, dass das in der *ssp2Δ*-Mutante beobachtete Wachstumsverhalten gegenüber den hier getesteten Bedingungen im Widerspruch mit der zuvor beobachteten Sensitivität gegenüber diesen Substanzen steht (Abb. 3.12). Dies scheint, wie bereits unter 3.2.11.1 beschrieben, darin begründet zu liegen, dass der Phänotyp der hier verwendeten *ssp2Δ*-Mutante zum Wildtyp-Phänotyp revertiert ist. Aus diesem Grund wurden die unter 3.2.5 beschriebenen Phänotypen zur Interpretation der erzielten Ergebnisse herangezogen.

Die Expression des *tor2*^{ts}-Allels in einer *ssp2*⁺-Deletionsmutante resultiert in einer Suppression der durch die *ssp2*⁺-Deletion vermittelten Sensitivität gegenüber Canavanin und Ethionin (Abb. 3.20). Einer Hyperaktivierung von *tor2*⁺, gleich einer Überexpression von *tor2*⁺ oder ähnlich einer Hyperaktivierung von Rhb1, resultiert in einer Resistenz gegenüber Canavanin, vermutlich durch die Hemmung der Aminosäureaufnahme (Weisman *et al.*, 2007; Urano *et al.*, 2005). Somit scheint die Suppression der Sensitivität in der *tor2*^{ts} *ssp2Δ*-Mutante in der Aminosäureaufnahme-Hemmung begründet zu liegen. In diesem Fall scheinen Ssp2 und Tor2 nicht in einem Signalweg zur Regulation der Aminosäureaufnahme zu agieren. Dies ist übereinstimmend mit der zuvor diskutierten Suppression der Sensitivität in den *tsc ssp2Δ*-Mutanten, basierend auf einer Fehllokalisierung der Aminosäuretransporter in den *tsc*-Mutanten (Aspuria and Tamanoi, 2008; Matsumoto *et al.*, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass eine *tor2*-temperatursensitive Mutante einen erhöhten Level an Proteindegradation, vermutlich ausgelöst durch den Verlust der negativen Regulation der Autophagie, aufweist (Uritani *et al.*, 2006). Aufgrund dessen wäre es möglich, dass der toxische Effekt von Ethionin und Canavanin in einer *tor2^{ts}*-Mutante nicht gegeben ist. Somit scheint die in einer *tor2^{ts}*-Mutante vorliegende erhöhte Proteindegradation die Suppression der durch die *ssp2⁺*-Deletion vermittelte Sensitivität gegenüber Canavanin und Ethionin in der *tor2^{ts} ssp2Δ*-Mutante zu vermitteln. In diesem Fall würden Ssp2 und Tor2 ebenfalls nicht in einem Signalweg zur Regulation der Aminosäureaufnahme agieren.

In der Anwesenheit von 2-DOG führte eine zusätzliche Deletion des *tsc1⁺*- und / oder des *tsc2⁺*-Gens in der *ssp2Δ*-Mutante zu dem gleichen phänotypischen Verhalten wie bei einer *tscΔ*-Mutante (Abb. 3.16 A). Eine Überexpression von *rhl1⁺* oder die gleichzeitige Expression eines *tor^{ts}*-Alles in der *ssp2Δ*-Mutante führt ebenso zu einer Suppression der 2-DOG-Sensitivität. Dementsprechend resultiert eine Hyperaktivierung des TSC/Rhl1/TOR-Signalweges in einer Suppression des Wachstumsdefektes in der *ssp2Δ*-Mutante. In einer Studie in Säugern von Jiang *et al.* (2008) konnte eine reduzierte Aufnahme von 2-DOG in *TSC2^{-/-}* als auch von *TSC1^{-/-}* beobachtet werden, die mit einer Fehllokalisierung der Glukosetransporter GLUT4 und GLUT1 einherging. Somit könnte die hier beobachtete Resistenz gegenüber 2-DOG in den *tscΔ*-Mutanten auch in einer verminderten Aufnahme von 2-DOG begründet liegen. Dies lässt vermuten, dass die Suppression, ähnlich der beschriebenen Suppression der Wachstumsdefekte gegenüber Canavanin und Ethionin in den *tscΔ ssp2Δ*-Mutanten, auf dem durch *tscΔ*-vermittelten Aufnahmedefekt basiert. Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Studie keine Fehllokalisierung des Glukosetransporters GLUT1 nachgewiesen werden (Buller *et al.*, 2008). Hier resultierte eine Deletion von *TSC2^{-/-}* in einer erhöhten Aufnahme des toxischen Aminosäureanalogons 2-DOG, während Wildtyp *TSC2^{+/+}* die Glukoseaufnahme über GLUT1 konstitutiv inhibierte (Buller *et al.*, 2008). In diesem Fall wäre aber Sensitivität der *tscΔ*-Mutanten gegenüber 2-DOG zu erwarten gewesen. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, müsste eine Aufnahmemessung von 2-DOG in den jeweiligen *tscΔ*-Mutanten in *S. pombe* durchgeführt werden.

Die Interpretation einer Inaktivierung von Tor2 und die resultierende Suppression der 2-DOG-Sensitivität in der *ssp2Δ*-Mutante ist schwierig einzuordnen. Zudem liegen in *S. pombe* keine Studien zur Regulation der Glukoseaufnahme im Zusammenhang mit dem TOR-Signalweg vor. In Folge könnte auch eine positive Regulation, ähnlich der wie von GLUT1 in Säugern beschrieben, durch den SpTORC1 vorliegen.

Im Gegensatz zu der vollständigen Suppression der Wachstumsdefekte in Anwesenheit von 2-DOG, Canavanin und Ethionin führte eine Hyperaktivierung des TSC/Rhl1-Signalweges nur teilweise zu einem Aufheben des Wachstumsdefektes bei 37 °C in einer *ssp2Δ*-Mutante. Eine ähnliche

Suppression konnte für eine *rhb1Δ tor2^{akt}* - Mutante beschrieben werden. Diese Mutante weist eine Sensitivität bei hoher Temperatur auf, jedoch wird die Sensitivität durch die Expression von *rhb1⁺* wieder aufgehoben (Urano *et al.*, 2007). Dementsprechend scheint Rhb1 in der Adaption an eine erhöhte Wachstumstemperatur (37 °C) unabhängig von Tor2 involviert zu sein (Urano *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu resultierte die Überexpression von *rhb1⁺* in der *ssp2Δ* - Mutante nicht in der Aufhebung der Temperatursensitivität. Somit scheint die teilweise Suppression in den *tscΔ ssp2Δ* - Mutanten nicht durch die Funktion von Rhb1 gegeben zu sein. Daher scheint Ssp2 unabhängig vom TSC / Rhb1 - Signalweg in die Adaption an das Wachstum bei erhöhter Temperatur involviert zu sein. In *S. pombe* spielt Sty1 / Spc1, das nahe verwandt mit der MAPK p38 aus Säugern ist, eine wichtige Rolle bei der Toleranz gegenüber verschiedener Stresssituationen wie zum Beispiel Stickstoffhunger, hohe Osmolarität und Wachstum bei erhöhter Temperatur (Kato *et al.*, 1996; Shiozaki and Russel, 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass in Säugern die Aktivierung der MAPK p38 im Zusammenhang mit der Aktivität der AMPK α steht. Die AMPK α stimuliert die Expression des Wachstumsfaktors VEGF (vascular endothelial growth factor) und die Angiogenese über die Aktivierung der MAPK p38 im Skelettmuskel (Ouchi *et al.*, 2005). Die MAPK p38 ist außerdem teilweise in die Stimulation der Glukoseaufnahme durch die AMPK α involviert (Xi *et al.*, 2001; Pelletier *et al.*, 2005). Eine Studie von Han *et al.* (2009a) zeigte zudem eine Aktivierung der AMPK α mittels eines Wachstumsinhibitors. Im Zuge dessen wurde die Inhibierung des Zellwachstums und / oder die Apoptose durch die AMPK α über die MAPK38 ausgelöst. In Anlehnung an die beobachtete Aktivierung der MAPK p38 durch die AMPK α in Säugern könnte Ssp2 in *S. pombe* ebenso in die Aktivierung des MAPK p38 homologen Sty1/Spc1 involviert sein.

Interessanterweise resultierte eine Hyperaktivierung des TSC / Rhb1 - Signaltransduktionsweges, ausgelöst durch die zusätzliche Deletion der *tsc* - Gene oder durch die Überexpression von *rhb1⁺*, nicht in einer Suppression des Zellwachstums in Anwesenheit nicht - fermentativer Kohlenstoffquellen, was eine TSC / Rhb1 - unabhängige Regulation schlussfolgern lässt (Abb. 3.16). Ebenso konnte in der *tor2^{ts} ssp2Δ* - Mutante bei 30 °C keine Suppression des Wachstumsdefektes der *ssp2Δ* - Mutante in Anwesenheit von Raffinose nachgewiesen werden (Abb. 3.20). In Folge dessen scheint Ssp2 unabhängig vom TOR - Signalweg in die Regulation der Verwertung nicht - fermentierbarer Kohlenstoffquellen beteiligt zu sein. Diese Vermutung kann durch die Studie von Matsumoto *et al.* (2007) unterstützt werden. In dieser wies eine *tor2⁺* - inaktive Mutante, welche über den TSC - Komplex negativ reguliert wird, keine Veränderung des Transkriptionsniveaus der Gene, welche unter Glukosehunger exprimiert werden, auf.

Eine Hyperaktivierung des TSC / Rhb1 - Signalweges führt in einer *ssp2Δ* - Mutante nicht zur Aufhebung der NaCl - Resistenz. Jedoch führte die Expression des *tor2^{ts}* - Allels in der *ssp2Δ* - Mutante zu einer Verstärkung der Resistenz gegenüber NaCl im Vergleich zu den Einzelmutanten

(Abb. 3.20 A + B). Dementsprechend scheint Ssp2 die Antwort auf osmotischen Stress TSC / Rhb1 - unabhängig zu regulieren. In einer Studie von Matsuo *et al.* (2007) wurde erstmals ein mögliches Vorliegen von Tor2 im SpTORC2 angedeutet. Allerdings könnte dies auf dem Effekt einer Überexpression von Tor2 basieren. In einer Interaktionsstudie von G. von Coelln konnte Tor2 nicht im SpTORC2 nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung). Aufgrund der in ihrer Arbeit durchgeführten genomischen Integration verschiedener Epitope zum Nachweis der Interaktion der einzelnen Komponenten in den TOR - Komplexen konnten so Überexpressionsartefakte ausgeschlossen werden. Dennoch konnte kürzlich gezeigt werden, dass in Minimalmedium Tor2 im SpTORC2 vorliegt (Hartmuth and Petersen, 2009). Im Zuge dessen könnte Tor2 eine vom TSC/Rhb1 - Signalweg unabhängige Rolle im SpTORC2 übernehmen, wobei aber noch keine biologische Funktion von Tor2 im SpTORC2 beschrieben werden konnte (Hartmuth and Petersen, 2009). Es ist bekannt, dass der SpTORC2 eine wichtige Rolle in der Adaption an verschiedene Stressbedingungen, wie zum Beispiel Wachstum bei erhöhter Temperatur und osmotischer Stress spielt (Weisman and Choder, 2001; Kawai *et al.*, 2001). Zwar wurde der Effekt einer Expression des *tor2^{ts}* - Allels in der *ssp2Δ* - Mutante in Anwesenheit von NaCl in Vollmedium durchgeführt, jedoch könnte hier Tor2 als Teil des SpTORC2 in die Adaption an NaCl - Stress involviert sein. Dies ist jedoch rein spekulativ und weiterführende Studien sind zwingend notwendig. Zudem ist auch nicht geklärt, ob die Verstärkung der Resistenz in der Doppelmutante auf einer Hyperaktivierung oder einer Inaktivierung von Tor2 basiert.

Sowohl die *tscΔ* - Mutanten als auch die *ssp2Δ* - Mutante weisen einen Verlust der sexuellen Differenzierung auf. Da eine *ssp2Δ* - Mutante vermutlich noch in der Lage ist, die Anwesenheit von Stickstoff wahrzunehmen, scheint Stickstofflimitation nur einen geringen Einfluss auf die sexuelle Differenzierung in der *ssp2Δ* - Mutante auszuüben (s. 4.2.2). Im Falle der *tscΔ* - Mutanten liegt die auftretende Sterilität hingegen in der fehlenden Inaktivierung des SpTORC2 in Antwort auf Stickstoffhunger begründet (Matsuo *et al.*, 2007; Nakase *et al.*, 2006; Alvarez and Moreno, 2006; Uritani *et al.*, 2006; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2002). Dementsprechend scheinen der TSC / Rhb1 - Signalweg und Ssp2 die sexuelle Differenzierung unabhängig voneinander zu regulieren. Zum einen wiesen die *tscΔ ssp2Δ* - Mutanten das gleiche Expressionsmuster der durch Stickstoffhunger induzierten Gene *ste11⁺*, *isp5⁺* und *isp4⁺* wie eine *tscΔ* - Mutante auf (Abb. 3.19). Zum anderen führte die zusätzliche Deletion des *tsc1⁺* - und / oder des *tsc2⁺* - Genes in der *ssp2Δ* - Mutante nicht zu einer Suppression der Paarungseffizienz, vermittelt durch eine Hyperaktivierung des TSC / Rhb1 - Signalweges (persönliche Mitteilung, A. Lorberg). Überraschenderweise konnte dies im Zuge dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine Hyperaktivierung des TSC / Rhb1 - Signalweges in der *ssp2Δ* - Mutante resultierte in einer Suppression der Paarungseffizienz (Abb. 3.18). Im Gegensatz zu der von A. Lorberg durchgeführten Studie, in welche die Mutanten in Vollmedium angezogen wurden, wurde hier die Überprüfung der Paarungseffizienz durch eine Anzucht der Zellen in

Minimalmedium durchgeführt. Eine ähnliche Beobachtung konnte für *cgs1* - Mutanten, die teilweise die Funktion der regulatorischen Untereinheit der cAMP - abhängigen Proteinkinase (Cgs1) unterdrücken, beschrieben werden (Stiefel *et al.*, 2004). In dieser Studie resultierte eine Voranzucht der *cgs1* - Mutanten in Vollmedium zu einem Verlust der Paarungseffizienz, hingegen resultierte die Voranzucht in Minimalmedium in einer teilweisen Suppression der Paarungseffizienz.

Im Zuge der Einordnung der Ssp2 - Funktion in den TOR - Signalweg deutete sich an, dass Ssp2 nicht wie in Säugern den TSC - Komplex reguliert. Um dies weiter zu untersuchen, wurde geschaut, wie sich eine zusätzliche Deletion des *ssp2*⁺ - Genes in einer *tsc1*⁺ *leu1-32* - und *tsc2*⁺ *leu1-32* - Mutante verhält. In Vollmedium weisen die *tsc1*⁺ - und *tsc2*⁺ - Deletionsmutante keinen Wachstumsdefekt auf, jedoch führt eine zusätzliche Leucin - Auxotrophie in diesen Mutanten zu einem Wachstumsdefekt (Matsumoto *et al.*, 2002). Dieser Defekt konnte durch das Austauschen der guten Stickstoffquelle Ammonium gegen die schlechte Stickstoffquelle Prolin aufgehoben werden (Weisman *et al.*, 2005). Diese Suppression könnte möglicherweise in einer erhöhten Expression von Aminosäurepermeasen, induziert durch die Stickstoffquelle Prolin, begründet liegen (Weisman *et al.*, 2005). Ähnlich den Leucin - auxotrophen *tscΔ* - Mutanten resultierte die Überexpression von *tor2*⁺ in einem für Leucin auxotrophen Stamm zu einem Wachstumsdefekt (Weisman *et al.*, 2007). Auch eine *tor1Δ leu1-32* - Mutante wies einen Wachstumsdefekt in Anwesenheit niedriger Leucin - Konzentrationen auf (Weisman *et al.*, 2007). Da sich die *tsc*⁺ - und die *tor1*⁺ - Deletion in einem für Leucin auxotrophen Stamm additiv verhielten, scheinen der TSC - Komplex und Tor1 in zwei parallelen Signalwegen die Aminosäureaufnahme positiv zu regulieren (Weisman *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von *ssp2*⁺ in einem Leucin - auxotrophen Stamm im Vergleich zum Wildtyp zu keinem Wachstumsdefekt bei niedrigen Leucin - Konzentrationen, sowohl in der Anwesenheit der Stickstoffquelle Ammonium als auch Prolin (Abb. 3.21 A + B). In Anwesenheit der Stickstoffquelle Ammonium konnte keine Suppression des Wachstumsdefektes in den *tscΔ ssp2Δ leu1-32* - Mutanten beobachtet werden. In Anwesenheit niedriger Leucin - Konzentrationen unter Verwendung von Prolin als Stickstoffquelle wuchsen die *tscΔ ssp2Δ leu1-32* - Mutanten allerdings wie eine *ssp2Δ leu1-32* - Mutante oder eine *leu1-32* - Mutante im Gegensatz zu den *tscΔ Δ leu1-32* - Mutanten, die unter gleichen Bedingungen einen Wachstumsdefekt zeigen (Abb. 3.21 B). Die beobachtete Suppression durch die zusätzliche Deletion von *ssp2*⁺ in einer *tsc1*⁺ *leu1-32* - oder *tsc2*⁺ *leu1-32* - Mutante könnte in einem verändert vorliegenden „Pool“ an Aminosäurepermeasen an der Plasmamembran begründet liegen. Die Deletion des *tsc1*⁺ - oder des *tsc2*⁺ - Genes führt zu Defekten bei der Induktion von Genen, die unter Stickstoffhunger exprimiert werden (Matsumoto *et al.*, 2007; van Slegtenhorst *et al.*, 2007; Abb. 3.19). Darunter würden auch hoch - affine Leucin - Transporter fallen, was den Wachstumsdefekt der *tsc1*⁺ *leu1-32* - oder *tsc2*⁺ *leu1-32* - Mutanten erklärt. Die zusätzliche Deletion von *ssp2*⁺ in diesen Mutanten wiederum erlaubt die Expression dieser Transporter unabhängig von den Tsc - Proteinen. In diesen Mutanten scheint die Wahrnehmung einer fehlender oder der schlechten

Stickstoffquelle Prolin wiederhergestellt zu sein. Diese Annahme wird auch von den Ergebnissen der Northern - Analyse gestützt. Zusammengenommen mit den Suppressionsstudien in der Anwesenheit von 2-DOG und Canavanin ist damit in *S. pombe* nur ein Modell denkbar, in dem Ssp2 und der TSC / Rhb1 / TORC1 - Signalweg einen „gemeinsamen Effektor“ unabhängig voneinander, jedoch abhängig von der verwendeten Stickstoffquelle, regulieren. Damit würde Ssp2 und der TOR - Signalweg das Zellwachstum an sich ändernde Stickstoff- und / oder Aminosäurekonzentrationen durch die Integration der verschiedenen Signale anpassen. Eine ähnliche Integration verschiedener Wachstumsbedingungen konnte auch für die Regulation der subzellulären Lokalisierung des GATA - Transkriptionsfaktors Gln3 durch Tor1 und Snf1 in *S. cerevisiae* beschrieben werden (Bertram *et al.*, 2002). In Säugern jedoch existieren verschiedene Ansichten in der Beteiligung der AMPK in der Regulation des mTORC1 durch die An- / Abwesenheit von Aminosäuren. So führt das Fehlen der Aminosäure Leucin zu einer Inaktivierung des mTORC1 (Hara *et al.*, 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von AMPK α die Leucin - induzierte Aktivierung von mTORC1 aufhebt (Du *et al.*, 2007). In einer Studie von Du *et al.* (2007) wurde postuliert, dass Leucin den mTORC1 über die Inhibierung der AMPK stimuliert. Dahingegen konnte die Gruppe um Suryawan *et al.* (2008) keine Beteiligung der AMPK an der Leucin - abhängigen Regulation des mTORC1 zeigen. Es ist möglich, dass die in den Säugerstudien gefundenen Unterschiede in der Durchführung der Experimente begründet liegen. In der Studie von Suryawan *et al.* (2008) wurde die Änderung der Phosphorylierung der AMPK α nach Zugabe von Leucin in jungen Schweinen untersucht, welche zuvor für ~ 14 h gehungert wurden. Durch die Untersuchung der Änderung der Phosphorylierung von AMPK α nach Hungerbedingungen, ist es möglich, dass eine aktiv vorliegende AMPK nicht durch die Leucinzugabe inhibiert wird. Dies konnte auch in der Studie, in welche eine negative Regulation der AMPK α durch Leucin postuliert wurde, beobachtet werden (Du *et al.*, 2007). Auch hier wurde keine Änderung in der Phosphorylierung einer aktiv vorliegenden AMPK α , ausgelöst durch die Behandlung mit AICAR, nach Leucinzugabe nachgewiesen. Jedoch führte die Expression einer dominant negativen Form der AMPK α zu einer reduzierten Leucin - induzierten Phosphorylierung von mTOR im Vergleich zu den Zellen, welche das Wildtyp - Allel der AMPK α exprimieren (Du *et al.*, 2007). In Folge dessen scheint die Aktivität der AMPK α eine Rolle in der Leucin - induzierten mTOR - Aktivierung zu spielen. In der Studie von Suryawan *et al.* (2008), welche die Beteiligung der AMPK α in die mTORC1 - Aktivierung nach Leucinzugabe ausschließt, wurden keine Untersuchungen durchgeführt, ob eine Änderung der Aktivität der AMPK einen Effekt auf die durch die Leucin - induzierte Aktivierung von mTORC1 ausübt. Daher ist es fraglich, ob eine Beteiligung der AMPK α in die Regulation des mTORC1 in Anwesenheit von Leucin ausgeschlossen werden kann.

In der folgenden Abbildung (4.2) sind die möglichen Modelle zur Regulation des Zellwachstums durch den TSC / Rhb1 / TOR - Signalweg in *S. pombe* zusammengefasst:

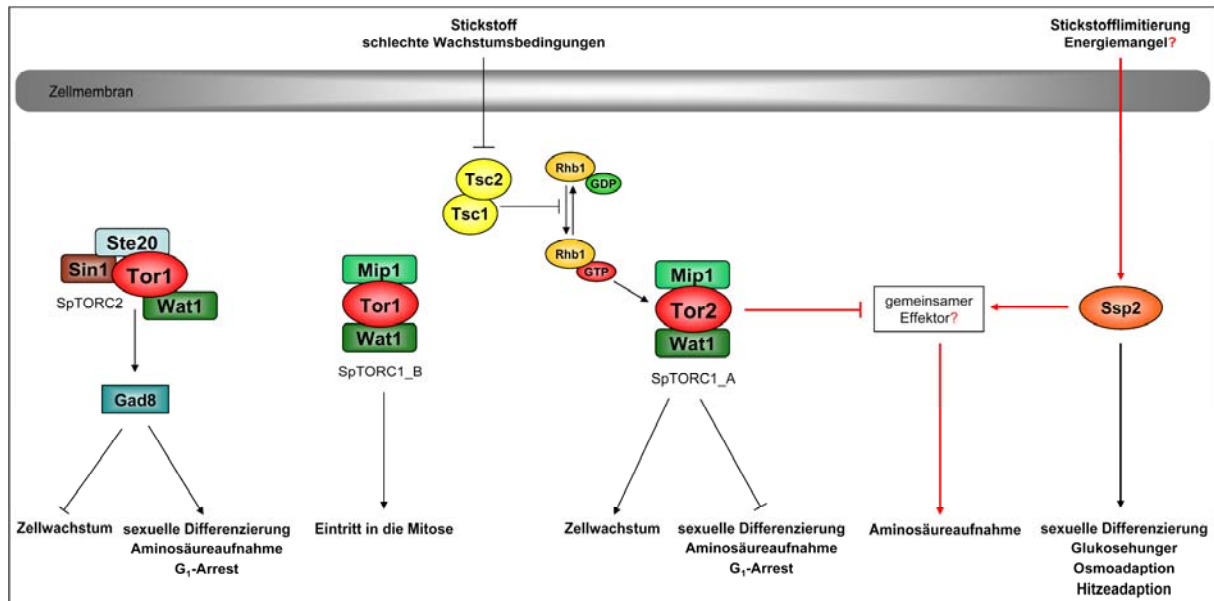


Abbildung 4.2: Potentielle Rolle der Ssp2-Funktion in einem zum TSC / Rhb1 / TOR - parallelen Signalweg. Über den TSC - Komplex wird die Aktivität der GTPase Rhb1 und in Folge dessen, die von TORC1 negativ reguliert. Der TORC1 reguliert das Zellwachstum positiv. Des Weiteren übt der TORC1 einen negativen Einfluss auf den G₁ - Arrest, die sexuelle Differenzierung und die Aminosäureaufnahme auf. Im Gegensatz dazu reguliert der TORC2 durch Phosphorylierung von Gad8 den G₁ - Arrest, die sexuelle Entwicklung und die Aminosäureaufnahme positiv. Der TORC2 scheint auch in der Regulation des Zellwachstums unter Hungerbedingungen involviert zu sein. Zudem kann unter schlechten Wachstumsbedingungen, jedoch nicht bei einem vorliegenden Nährstoffhunger, Tor1 im SpTORC1 vorliegen und den Eintritt in die Mitose positiv regulieren. Die in Rot gekennzeichneten Pfeile stellen die in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse der Adaption des Zellwachstums an Umweltbedingungen durch den TSC / TOR - Signalweg und Ssp2 dar. Der TSC / TOR2 - Signalweg und Ssp2 agieren parallel in der Regulation der Aminosäureaufnahme, vermutlich über einen gemeinsamen Effektor. Hierbei ist jedoch noch nicht bekannt, welcher Effektor in seiner Aktivität durch Tor2 und / oder Ssp2 moduliert wird. Des Weiteren ist Ssp2 in die Adaption an verschiedene Stressbedingungen unabhängig vom TSC / Rhb1 / TOR - Signalweg involviert. Modifiziert nach Otsubo and Yamamoto *et al.* (2008).

4.4. Identifizierung neuer Wechselwirkungspartner des Tsc1 - und des Tsc2 - Proteins

Zur Identifizierung neuer Wechselwirkungspartner des Tsc1 - und des Tsc2 - Proteins wurde die „TAP“- Reinigung verwendet. In mittels Silberfärbung gefärbter SDS - Gele konnte neben der potentiellen Bande des Tsc1 - Proteins (~110 kDa) eine weitere ko - eluierende Bande bei ~30 kDa detektiert werden (Abb. 3.23 B). Leider war die bisherige Proteinmenge zu gering für eine massenspektrometrische Identifizierung der eluierten Banden. Daher kann nicht unterschieden werden, ob diese Abbauprodukte des Tsc1 - Proteins darstellen oder ob die eluierten Banden neue Wechselwirkungspartner des Tsc1 - Proteins sind. In einem „Di-Hybrid-System“ konnten zwei neue Interaktionspartner des Tsc1 - Proteins identifiziert werden: die Phosphatidylinositol 4-Kinase Lsb6 und die Asparagin - Synthetase Asn1 (persönliche Mitteilung, A. Lorberg). Das Lsb6 - Protein weist ein theoretisches Molekulargewicht von ~72 kDa, während das Asn1 - Protein ein theoretisches Molekulargewicht von ~63 kDa hat. Damit haben die Proteine Lsb6 und Asn1 ein zu hohes Molekulargewicht, um diese der ko - eluierten Bande bei ~30 kDa zuzuordnen. Da die eingesetzte

Proteinmenge zu gering war, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese Proteine *in vivo* mit Tsc1 interagieren und nach einer Reinigung ko - eluieren. Zur Identifizierung der ko - eluierenden Proteine wäre eine Optimierung der „TAP“ - Reinigung und eine Aufreinigung im Großmaßstab nötig (Proteinpräparation aus einer 30 - 50 l - Kultur), die jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

Ebenso konnte auf SDS - Gelen neben der potentiellen Bande des Tsc2 - Proteins (~150 kDa) drei weitere ko - eluierende Banden bei ~60 kDa, ~40 kDa und ~35 kDa detektiert werden (Abb. 3.23 D). Leider war auch hier die eingesetzte Proteinmenge zu gering für eine massenspektrometrische Identifizierung der ko - eluierenden Banden. Ebenfalls für die Identifizierung der ko - eluierenden Proteine des Tsc2 - Proteins wäre noch eine Optimierung der „TAP“ - Reinigung und Aufreinigung im Großmaßstab nötig, die jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnte.

5. Zusammenfassung

Die Anpassung des Zellwachstums eukaryotischer und prokaryotischer Zellen an sich ändernde intra- und extrazelluläre Signale wie Nährstoffverfügbarkeit, Wachstumsfaktoren und dem zellulären Energielevel bedarf eines effektiven Regulationssystems. In Säugern übernimmt der TSC - Komplex als negativer Regulator des TSC / RHEB / TOR - Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellwachstums. In dem Modellorganismus *S. pombe* ist der TSC - Komplex konserviert, jedoch liegen noch keine Untersuchungen zu seiner Regulation vor. Interessanterweise existieren in *S. pombe* auch Homologe der Untereinheiten der AMP - abhängigen Kinase (AMPK), von denen aus Säugern bekannt ist, dass sie den TSC - Komplex positiv regulieren. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels biochemischer Studien die Existenz von zwei funktionell getrennten AMPK -Komplexen nachgewiesen werden: AMPK I, bestehend aus Ssp2 (α_1), SPCC1919.03c (β) und Cbs2 (γ) und AMPK II, bestehend aus Ppk9 (α_2), SPCC1919.03c (β) und Cbs2 (γ). Wie in Säugern wird Ssp2 als auch Ppk9 an einem konservierten T189 - bzw. T178 - Rest phosphoryliert, wobei die Phosphorylierbarkeit von Ssp2 am T189 absolut notwendig für dessen Funktionalität ist. Ssp2 wird am T189 bei Glukose- und Stickstofflimitation, ebenso wie bei zunehmender optischer Dichte phosphoryliert. Da bei zunehmender optischer Dichte keine Glukoselimitierung eintritt und Stickstoffhunger nur eine geringe Phosphorylierung von Ssp2 induziert, deutet sich an, dass in *S. pombe* ein weiteres, bisher noch nicht identifiziertes Salz / Spurenelement oder extrazellulär ausgeschiedenes Signalmolekül existieren muss, dass bei zunehmender optischer Dichte die Phosphorylierung induziert. Genetische Daten lassen zudem eine Beteiligung von AMPK I an der Regulation der sexuellen Differenzierung, der Adaption an osmotischen Stress und der Verwertung nicht -fermentierbarer Kohlenstoffquellen vermuten. AMPK II scheint für die Adaption an Cadmiumstress wichtig zu sein.

Mittels genetischer Studien wurde eine Beteiligung der beiden AMPK α - Isoformen am TSC/Rhb1/TOR -Signalweg in *S. pombe* näher untersucht. Dabei deutete sich an, dass Ppk9 und der TSC -Komplex weder synergistische noch antagonistische Funktionen in der Zelle ausüben. Im Gegensatz dazu scheinen Ssp2 und die TSC - Proteine antagonistische Funktionen auszuüben. Einige Wachstumsdefekte der *ssp2 Δ* - Mutanten können durch eine Hyperaktivierung des TSC / Rhb1 / TOR - Signalweges supprimiert werden. Die Defekte bei der sexuellen Differenzierung, der Verwertung nicht - fermentierbarer Kohlenstoffquellen und bei osmotischem Stress dagegen werden nicht supprimiert. Überraschenderweise führt die Deletion von *ssp2*⁺ zu einer Suppression des Wachstumsdefektes von Leucin - auxotrophen *tsc* - Mutanten unter Leucin - limitierenden Bedingungen. Diese Beobachtung erlaubt die Einordnung von Ssp2 in einem zum TSC / Rhb1/TOR - Weg parallelen Signalweg. Im Gegensatz zu Säugern scheinen in *S. pombe* TSC / Rhb1 / TORC1 und Ssp2 einen „gemeinsamen Effektor“ unabhängig voneinander zu regulieren, um verschiedene Wachstumsbedingungen miteinander zu integrieren und das Zellwachstum entsprechend anzupassen.

6. Summary

The ability to sense and integrate a wide variety of signals, including growth factors, amino acids and energy availability to regulate cell growth is essential for both prokaryotic and eukaryotic organisms. In mammalian cells the TSC complex has emerged as an important negative regulator of the TSC / RHEB / TOR signal transduction pathway to finally regulate cell growth. In the unicellular model eukaryote *Schizosaccharomyces pombe* the TSC complex is conserved but so far no mode of its regulation has been elucidated. Interestingly the *S. pombe* genome also codes for homologues of the AMP - activated kinase (AMPK) subunits. In mammals active AMPK positively regulates the TSC complex. This study provides biochemical evidence that in *S. pombe* two functionally distinct AMPK complexes exist: AMPK I consisting of Ssp2, SPCC1919.03c and Cbs2, whereas Ppk9 forms a complex with SPCC1919.03c and Cbs2 to build AMPK II. Like mammalian AMPK α Ssp2 and Ppk9 become phosphorylated on a conserved T189 (for Ssp2) or T178 (for Ppk9) residue respectively. Phosphorylation of T189 is essential for Ssp2 function and is regulated in response to carbon and nitrogen starvation and to increasing optical density of the culture. Since carbon starvation cannot account for phosphorylation during increasing optical density and nitrogen starvation only causes weak Ssp2 phosphorylation another signal or an extracellular released signal molecule must exist that leads to Ssp2 phosphorylation. Furthermore, genetic data suggest that AMPK I is involved in the regulation of sexual differentiation, the response to osmotic stress and the consumption of non - fermentable carbon sources. However, AMPK II seems to be involved in the adaption to cadmium exposure.

By using genetic approaches the role of both *S. pombe* AMPK α isoforms within the TSC / Rhb1 / TOR signalling pathway was analysed. These studies indicate that Ppk9 and the TSC complex perform neither synergistic nor antagonistic functions within the cell. In contrast, Ssp2 and the TSC complex seem to act antagonistically. Deletion of *ssp2*⁺ results in sensitivity against 2-DOG and defects in amino acid uptake. These defects are rescued by hyperactivation of the TSC / Rhb1 / TOR signaling branch. Ssp2 also functions in sexual differentiation, consumption of non - fermentable carbon sources and in the response to osmotic stress. These functions are regulated independently of the TSC / Rhb1 / TOR pathway. Surprisingly, under leucine - limiting conditions, the growth defect of auxotrophic leucine *tsca* mutants is rescued by deletion of *ssp2*⁺. All these observations taken together lead to a model in which Ssp2 act in parallel pathway to the TSC / Rhb1 / TOR signalling branch. In contrast to mammalian cells, in the fission yeast *S. pombe* TSC / Rhb1 / TOR and Ssp2 independently integrate different growth conditions by regulating a common effector to finally regulate cell growth.

7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2-DOG	2-Deoxyglukose (toxisches Glukoseanalogon)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxisulfat
As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp, kb	Basenpaar, Kilobasenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CaCl ₂	Calciumchlorid
CdAc	Cadmiumacetat
Ci	Curie (Einheit der radioaktiven Aktivität)
cpm	„counts per minute“ (Maß der radioaktiven Aktivität)
D	Glukose
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMM	„Edinburgh Minimal Medium“
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GDP, GTP	Guanosindiphosphat, Guanosintriphosphat
Glu	Glutamat
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HP	„high speed pellet“
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid

Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LP	„low speed pellet“
M, mM, μ M	Molar, Millimolar, Mikromolar
MgAc	Magnesiumacetat
min	Minute(n)
ml, l, μ l	Milliliter, Liter, Mikroliter
mRNA	„messenger RNA“
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer (Angabe für Wellenlänge)
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen - Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Phosphataseinhibitoren
Rap	Rapamycin
RE	Rohextrakt
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	Sorbitol
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	„Sodiumdodecylsulfat“ (Natriumdodecylsulfat)
SN	„supernatant“ (Überstand)
Tab.	Tabelle
TAP	“Tandem affinity purification” (Tandem Affinitäts Aufreinigung)
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Enzymeinheiten)
UV	ultraviolette Strahlung
ÜN	über Nacht
V	Volt
w/o	„without“ (ohne)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
YE	„Yeast extract“
YE5S	„Yeast extract“ mit Aminosäure- / Basenmix (Vollmedium <i>S. pombe</i>)
YEPD, YP	„Yeast extract-Pepton-Dextrose“ (Vollmedium <i>S. cerevisiae</i>)

Nukleotide und Aminosäuren sind mit dem Ein-Buchstaben-Code (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature) abgekürzt.

8. Anhang

Nachweis und Funktionsanalyse der in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteinen

Um das Tsc1 -, Tsc2 -, Ssp2 - und Ppk9 - Protein zum Beispiel mittels „Westernblot“ - Analyse besser untersuchen zu können, wurden zunächst Stämme hergestellt, bei denen die jeweiligen Gene unter dem eigenen Promotor exprimiert werden und genomisch am 3´-Ende mit Sequenzen fusioniert sind, die für den so genannten „TAP-Tag“, das 13myc - Epitop oder das 3HA - Epitop (s. Material und Methoden) kodieren. Zunächst wurden diese Stämme verschiedenen Wachstumsanalysen unterzogen, um einen Einfluss des Fusionsanteiles auf die Funktion der Fusionsproteine auszuschließen. Die Generationszeit der Stämme, die die jeweiligen Fusionsproteine exprimieren, wiesen keine Unterschiede im Zellwachstum gegenüber dem Wildtyp auf (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde mit Hilfe von Tropftests die Phänotypen dieser Stämme im Vergleich zum Wildtyp und den entsprechenden Deletionsmutanten untersucht. Falls die Fusionsproteine funktionell sind, sollten die entsprechenden Stämme keine Unterschiede im Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigen. Wie unter Abb. 8.1 zu sehen, kann ein Einfluss des Fusionsanteils auf die Funktion von Tsc1, Tsc2, Ssp2 (α_1 -UE), Ppk9 (α_2 -UE), SPCC1919.03 (β -UE) und Cbs2 (γ -UE) ausgeschlossen werden.

Für die anschließenden Untersuchungen der jeweiligen Fusionsproteine wurden die Transformanden gegen den Ausgangstamm (972) rückgekreuzt. Dies diente der Eliminierung möglicher Mutationen, die durch die vorangegangene Transformation im Stammhintergrund entstanden sein könnten.

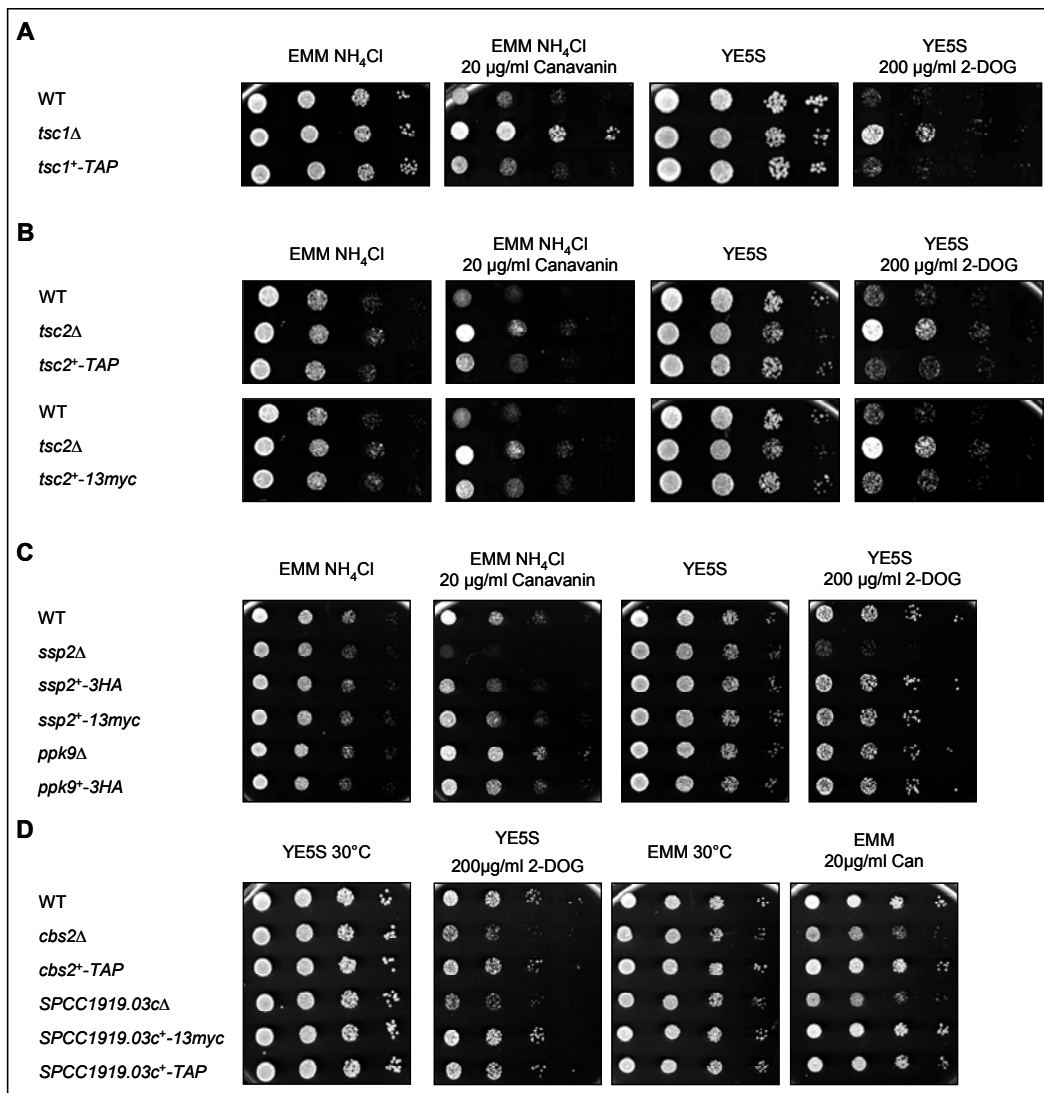


Abbildung 8.1: Funktionalitätsüberprüfung. Zur Überprüfung der Funktionalität wurden die *S. pombe*-Stämme **A:** WT (972), *tsc1*Δ (SPAD1-4) und *tsc1*⁺-TAP (SPKS1) **B:** WT (972), *tsc2*Δ (SPAD28-9A), *tsc2*⁺-TAP (SPKS6-1) und *tsc2*⁺-13myc (SPKS12-3) **C:** WT (972), *ssp2*Δ (SPKS33-4B), *ssp2*⁺-3HA (SPKS15-1C), *ssp2*⁺-13myc (SPKS19-1A), *ppk9*Δ (SPKS98-2C) und *ppk9*⁺-3HA (SPKS78-3A) **D:** WT (972), *cbs2*Δ (SPKB5-2), *cbs2*⁺-TAP (SPKS67-2), *SPCC1919.03c*Δ (SPKB3-1), *SPCC1919.03c*⁺-13myc (SPKB1-2) und *SPCC1919.03c*⁺-TAP (SPKB2-10) verwendet. Die Platten wurden 2 - 4 Tage bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert.

Einfluss von 2-DOG auf *S. pombe* - Wildtypzellen

In Säugern wird das toxische Glukoseanalogon 2-DOG wie Glukose in die Zelle transportiert und zu 2-Deoxyglukose-6-Phosphat phosphoryliert. Jedoch kann es nicht über die im Kohlenhydratmetabolismus involvierten Enzyme, welche Glukose-6-Phosphat, jedoch nicht 2-Deoxyglukose-6-Phosphat verstoffwechseln metabolisiert werden (Gee *et al.*, 1974, Mukkada and Bonventre, 1975). Dies resultiert in einer eintretenden Energielimitation und zu einem erhöhten AMP / ATP - Verhältnis, wobei über AMP die AMPK α in Säugerzellen aktiviert wird. In Folge wird TSC2 von der AMPK α phosphoryliert und durch diese Phosphorylierung der TSC - Komplexes stabilisiert und aktiviert (Inoki *et al.*, 2003a). Dahingegen ist in *S. pombe* nicht bekannt, ob die Zugabe von 2-DOG in einer Energielimitation resultiert. Eher scheint der inhibitorische Effekt von 2-DOG in einer eintretenden Zellwandlyse durch die Inhibierung einiger Reaktionen zur Bildung der Vorstufen für Zellwandpolysaccharide begründet zu liegen (Megnet *et al.*, 1965). Wie unter Abb. 8.2 A zu sehen, führt die Zugabe von 2-DOG (t0) mit einer Endkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ bereits nach zwei Stunden zu einem verminderten Zellwachstum des Wildtypes. Jedoch lagen die mit 2-DOG (200 $\mu\text{g/ml}$) behandelten Zellen ca. 50 % lysiert vor. Um Bedingungen zu finden, in welchen die mit 2-DOG behandelten Zellen nicht lysieren, jedoch 2-DOG noch energielimitierend wirkt, wurde eine Wachstumsanalyse durchgeführt. Eine Endkonzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ 2-DOG führt ähnlich wie bei 200 $\mu\text{g/ml}$ 2-DOG zu einem verminderten Zellwachstums des Wildtypes. Doch auch unter dieser Bedingung führt die Zugabe von 2-DOG zu einer sofortigen Lyse der Zellen (Abb. 8.2 C -S). Erst nach 12 h fand nur noch eine geringe Lyse der Zellen statt.

Da der Wildtyp bei einer Konzentration von 70 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ 2-DOG stetig Zellwachstum aufwies (Abb. 8.2 D), wurde in einem weiteren Ansatz die Zugabe des osmotischen Stabilisators Sorbitol auf die Zelllyse und das Zellwachstum des Wildtypes, welcher mit einer Endkonzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ und 200 $\mu\text{g/ml}$ 2-DOG behandelt wurde, untersucht. Die Zugabe von Sorbitol resultierte nach 2 h 2-DOG - Behandlung in dem gleichen verminderten Zellwachstum im Vergleich zu unbehandelten Wildtypzellen (Abb. 8.2 B). Gleich denen ohne Sorbitol angezogenen Wildtypzellen fand erst nach 12 h nur noch eine geringe Lyse der Zellen statt (Abb. 8.2 C +S).

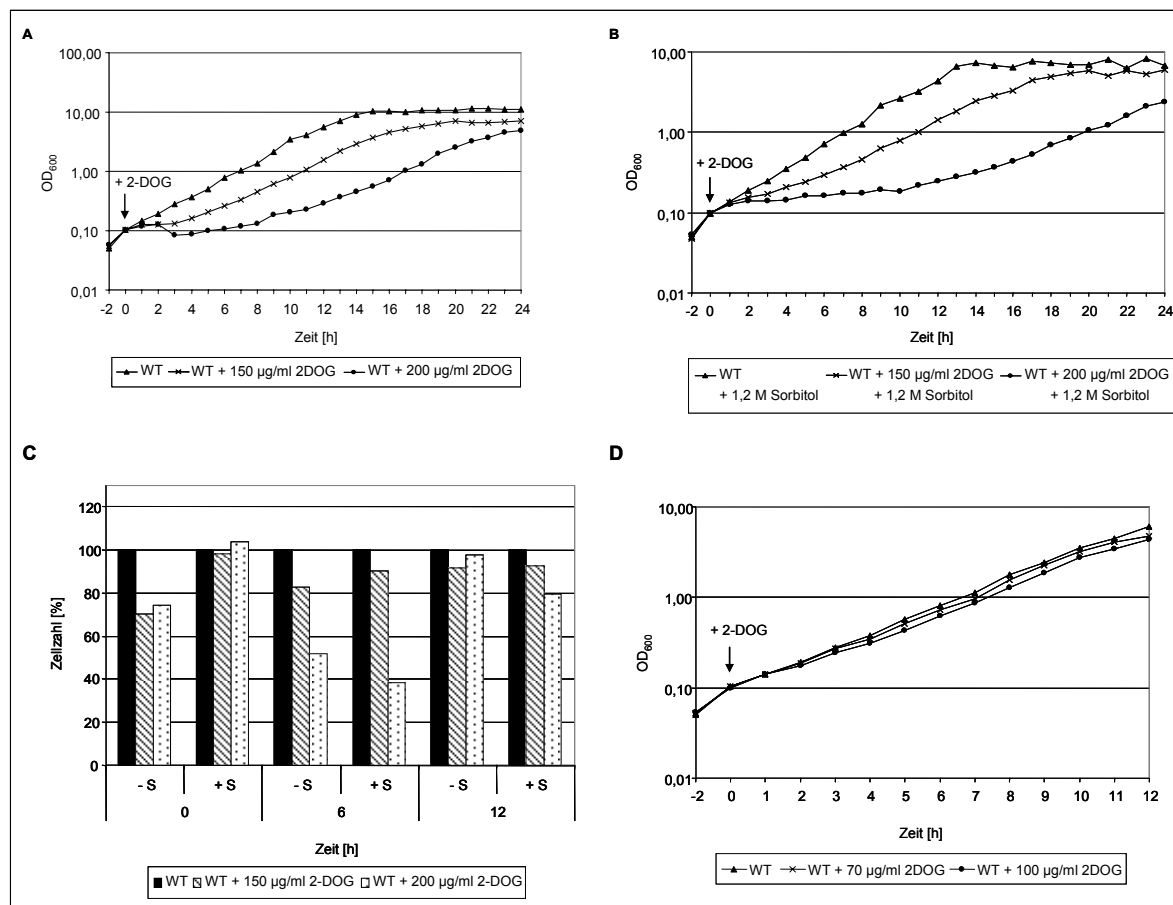


Abbildung 8.2: Einfluss von 2-DOG auf *S. pombe* - Wildtypzellen. **A:** Der *S. pombe* - Stamm WT (972) wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~0,05 in YE - Medium angezogen und anschließend mit 2-DOG (Endkonzentration: 150 µg/ml bzw. 200 µg/ml) versetzt (t_0). Das Zellwachstum wurde für 24 h verfolgt und die OD₆₀₀ logarithmisch in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. **B:** Der *S. pombe* - Stamm WT (972) wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~0,05 in YE - Medium + 1,2 M Sorbitol angezogen und anschließend mit 2-DOG (Endkonzentration: 150 µg/ml bzw. 200 µg/ml) versetzt (t_0). Das Zellwachstum wurde für 24 h verfolgt und die OD₆₀₀ logarithmisch in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. **C:** Zur Quantifizierung der durch 2-DOG ausgelösten Zellyse wurden nach 0 h, 6 h und 12 h 10^4 Zellen auf YE - Medium ausgestrichen und für 3 - 5 Tage bei 30°C inkubiert. Der Zeitpunkt t_0 wurde auf 100 % gesetzt. **D:** Der *S. pombe* - Stamm WT (972) wurde bis zu einer OD₆₀₀ ~0,05 in YE - Medium angezogen und anschließend mit 2-DOG (Endkonzentration: 70 µg/ml bzw. 100 µg/ml) versetzt. Das Zellwachstum wurde für 12 h verfolgt und die OD₆₀₀ logarithmisch in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen.

9. Literaturverzeichnis

- Alderson A., P. A. Sabelli, J. R. Dickinson, D. Cole, M. Richardson, M. Kreis, P. R. Shewry and N. G. Halford** (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8602-8605.
- Alessi, D. R., F. B. Caudwell, M. Andjelkovic, B. A. Hemmings and P. Cohen** (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399, 333-338.
- Alvarez, B. and S. Moreno** (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J. Cell Sci.* 119, 4475-4485.
- Amodeo G. A., M. J. Rudolph and L. Tong** (2007). Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* 449(7161), 492-495.
- Anderberg R. J. and M. K. Walker-Simmons** (1992). Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10183-10187.
- Anthony J. C., F. Yoshizawa, T. G. Anthony, T. C. Vary, L. S. Jefferson and S. R. Kimball** (2000). Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr.* 130(10), 2413-2419.
- Arellano M., M. H. Valdivieso, T. M. Calonge, P. M. Coll, A. Duran and P. Perez** (1999). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci.* 112(20), 3569-3578.
- Aspuria P. J. and F. Tamanoi** (2008). The Tsc/Rheb signaling pathway controls basic amino acid uptake via the Cat1 permease in fission yeast. *Mol Genet Genomics* 279(5), 441-450.
- Aspuria, P. J., T. Sato and F. Tamanoi** (2007). The TSC/Rheb/TOR signaling pathway in fission yeast and mammalian cells: temperature sensitive and constitutive active mutants of TOR. *Cell Cycle* 6, 1692-1695.
- Aspuria, P. J. and F. Tamanoi** (2004). The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal* 16, 1105-1112.
- Astrinidis, A., W. Senapedis, T. R. Coleman and E. P. Henske** (2003) Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B. *J. Biol. Chem.* 278, 51372-51379.
- Baba M., M. Furihata, S. B. Hong, L. Tassarollo, D. C. Haines, E. Southon, V. Patel, P. Igarashi, W. G. Alvord, R. Leighty, M. Yao, M. Bernardo, L. Ileva, P. Choyke, M. B. Warren, B. Zbar, W. M. Linehan and L. S. Schmidt** (2008). Kidney-targeted Birt-Hogg-Dube gene inactivation in a mouse model: Erk1/2 and Akt-mTOR activation, cell hyperproliferation, and polycystic kidneys. *J Natl Cancer Inst.* 100(2), 140-154.
- Baba M., S. B. Hong, N. Sharma, M. B. Warren, M. L. Nickerson, A. Iwamatsu, D. Esposito, W. K. Gillette, R. F. Hopkins, J. L. Hartley, M. Furihata, S. Oishi, W. Zhen, T. R. Burke, W. M. Linehan, L. S. Schmidt and B. Zbar** (2006). Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(42), 15552-15557.
- Bähler J., J. Q. Wu, M. S. Longtine, N. G. Shah, A. McKenzie, A. B. Steever, A. Wach, P. Philippsen and J. R. Pringle** (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14(10), 943-951.
- Bai, X., D. Ma, A. Liu, X. Shen, Q. J. Wang, Y. Liu and Y. Jiang** (2007). Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science* 318, 977-980.
- Barba G., T. Soto, M. Madrid, A. Núñez, J. Vicente, M. Gacto and J. Cansado** (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal.* 20(4), 748-757.
- Barbet N., W. J. Muriel and A. M. Carr** (1992). Versatile shuttle vectors and genomic libraries for use with *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 114(1), 59-66.
- Beck T., A. Schmidt and M. N. Hall** (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J Cell Biol.* 146(6), 1227-1238.
- Bertram P. G., J. H. Choi, J. Carvalho, T. F. Chan, W. Ai and X. F. Zheng** (2002). Convergence of TOR-nitrogen and Snf1-glucose signaling pathways onto Gln3. *Mol Cell Biol.* 22(4), 1246-52.

- Bilanges B., R. Argonza-Barrett, M. Kolesnichenko, C. Skinner, M. Nair, M. Chen and D. Stokoe** (2007). Tuberos sclerosis complex proteins 1 and 2 control serum-dependent translation in a TOP-dependent and -independent manner. *Mol Cell Biol.* 27(16), 5746-5764.
- Bimbó A., Y. Jia, S. L. Poh, R. K. Karuturi, N. den Elzen, X. Peng, L. Zheng, M. O'Connell, E. T. Liu, M. K. Balasubramanian and J. Liu** (2005). Systematic deletion analysis of fission yeast protein kinases. *Eukaryot Cell* 4(4), 799-813.
- Bolster D. R., S. J. Crozier, S. R. Kimball and L. S. Jefferson** (2002). AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem.* 277(27), 23977-23990.
- Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brugarolas J., K. Lei, R. L. Hurley, B. D. Manning, J. H. Reiling, E. Hafen, L. A. Witters, L. W. Ellisen and W. G. Kaelin** (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18(23), 2893-2904.
- Buller C. L., R. D. Loberg, M. H. Fan, Q. Zhu, J. L. Park, E. Vesely, K. Inoki, K. L. Guan and F. C. Brosius** (2008). A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295(3), 836-843.
- Burgstaller S., M. Rosner, C. Lindengrün, M. Hanneder, N. Siegel, A. Valli, C. Fuchs and M. Hengstschläger** (2009). Tuberin, p27 and mTOR in different cells. *Amino Acids* 36(2), 297-302.
- Burnett, P. E., R. K. Barrow, N. A. Cohen, S. H. Snyder and D. M. Sabatini** (1998). RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1432-1437.
- Byfield M. P., J. T. Murray and J. M. Backer** (2005). hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem.* 280(38), 33076-33082.
- Cai S. L., A. R. Tee, J. D. Short, J. M. Bergeron, J. Kim, J. Shen, R. Guo, C. L. Johnson, K. Kiguchi and C. L. Walker** (2006). Activity of TSC2 is inhibited by Akt-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J. Cell Biol.* 172, 279-289.
- Calero F., V. Montiel, Z. Caracuel, F. Cabello-Hurtado and J. Ramos** (2004). On the role of Trk1 and Trk2 in *Schizosaccharomyces pombe* under different ion stress conditions. *FEMS Yeast Res.* 4(6), 619-624.
- Calero F., N. Gómez, J. Ariño and J. Ramos** (2000). Trk1 and Trk2 define the major K(+) transport system in fission yeast. *J Bacteriol.* 182(2), 394-399.
- Cannon J.F., J. R. Pringle, A. Fiechter and M. Khalil** (1994). Characterization of glycogen-deficient glc mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 136(2), 485-503.
- Carling D., K. Aguan, A. Woods, A. J. M. Verhoeven, R. K. Beri, C. H. Brennan, C. Sidebottom, M. D. Davison and J. Scott** (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J Biol Chem* 269, 11442-11448.
- Castro A. F., J. F. Rebhun, G. J. Clark and L. A. Quilliam** (2003). Rheb binds tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) and promotes S6 kinase activation in a rapamycin- and farnesylation-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 278, 32493-32496.
- Celenza J. L., F. J. Eng and M. Carlson** (1989). Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5045-5054.
- Celenza J. L. and M. Carlson** (1989). Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5034-5044.
- Celenza J. L. and M. Carlson** (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233(4769), 1175-1180.
- Celenza J. L. and M. Carlson** (1984). Structure and expression of the SNF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 54-60.
- Chapman A. B.** (2007). Autosomal dominant polycystic kidney disease: time for a change? *J Am Soc Nephrol.* 18(5), 1399-1407.

- Chavez J. A., W. G. Roach, S. R. Keller, W. S. Lane and G. E. Lienhard** (2008). Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 283(14), 9187-9195.
- Cheng S. W., L. G. Fryer, D. Carling and P. R. Shepherd** (2004). Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem.* 279(16), 15719-15722.
- Chong-Kopera, H., K. Inoki, Y. Li, T. Zhu, F. R. Garcia-Gonzalo, J. L. Rosa and K. L. Guan** (2006). TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J. Biol. Chem.* 281, 8313-8316.
- Colonna W. J. and P. T. Magee** (1978). Glycogenolytic enzymes in sporulating yeast. *J. Bacteriol.* 134, 844-853.
- Corradetti M. N., K. Inoki, N. Bardeesy, R. A. DePinho and K. L. Guan** (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev.* 18(13), 1533-1538.
- Corton J. M., J. G. Gillespie, S. A. Hawley and D. G. Hardie** (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem.* 229(2), 558-565.
- Crespo J. L., T. Powers, B. Fowler and M. N. Hall** (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(10), 6784-6789.
- Crute B. E., K. Seefeld, J. Gamble, B. E. Kemp and L. A. Witters** (1998). Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 273(52), 35347-35354.
- Dan, H. C., M. Sun, L. Yang, R. I. Feldmann, X. M. Sui, R. S. Yeung, D. J. Halley, S. V. Nicosia, W. J. Pledger and J. Q. Cheng** (2002). PI3K/Akt pathway regulates TSC tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J. Biol. Chem.* 277, 35364-35370.
- Davies S. P., N. R. Helps, P. T. Cohen and D. G. Hardie** (1995). 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 377(3), 421-425.
- Davies S. P., S. A. Hawley, A. Woods, D. Carling, T. A. J. Haystead and D. G. Hardie** (1994). Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-Sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem* 223, 351-357.
- Dennis P. B., A. Jaeschke, M. Saitoh, B. Fowler, S. C. Kozma and G. Thomas** (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.
- DeYoung M. P., P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi and L. W. Ellisen** (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 22(2), 239-251.
- Dohmen R. J., A. W. Strasser, C. B. Honer and C. P. Hollenberg** (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* 7, 691-692.
- Dong J. and D. Pan** (2004). Tsc2 is not a critical target of Akt during normal *Drosophila* development. *Genes Dev.* 18(20), 2479-2484.
- Du M., Q. W. Shen, M. J. Zhu and S. P. Ford** (2007). Leucine stimulates mammalian target of rapamycin signaling in C2C12 myoblasts in part through inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *J Anim Sci.* 85(4), 919-927.
- Dubbelhuis P. F. and A. J. Meijer** (2002). Hepatic amino acid-dependent signaling is under the control of AMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* 521(1-3), 39-42.
- Dyck J. R., G. Gao, J. Widmer, D. Stapleton, C. S. Fernandez, B. E. Kemp and L. A. Witters** (1996). Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. *J Biol Chem.* 271(30), 17798-17803.
- Easwaran V., S. H. Lee, L. Inge, L. Guo, C. Goldbeck, E. Garrett, M. Wiesmann, P. D. Garcia, J. H. Fuller, V. Chan, F. Randazzo, R. Gundel, R. S. Warren, J. Escobedo, S. L. Aukerman, R. N. Taylor and W. J. Fantl** (2003). beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* 63(12), 3145-3153.

- Elbing K., R. R. McCartney and M. C. Schmidt** (2006). Purification and characterization of the three Snf1-activating kinases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 393(3), 797-805.
- Erickson J. R. and M. Johnston** (1993). Genetic and molecular characterization of GAL83: its interaction and similarities with other genes involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 135, 655-664.
- Escobar J., J. W. Frank, A. Suryawan, H. V. Nguyen, S. R. Kimball, L. S. Jefferson and T. A. Davis** (2005). Physiological rise in plasma leucine stimulates muscle protein synthesis in neonatal pigs by enhancing translation initiation factor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288(5), 914-921.
- Estruch F., M. A. Treitel, X. Yang and M. Carlson** (1992). N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics* 132, 639-650.
- Feinberg A. P. and B. Vogelstein** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- Fonseca B. D., E. M. Smith, V. H. Lee, C. MacKintosh and C. G. Proud** (2007). PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex. *J Biol Chem.* 282(34), 24514-24524.
- Frias, M. A., C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr and D. M. Sabatini** (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16, 1865-1870.
- Fryer L. G., F. Foufelle, K. Barnes, S. A. Baldwin, A. Woods and D. Carling** (2002). Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J.* 363(1), 167-174.
- Gan B., Z. K. Melkounian, X. Wu, K. L. Guan and J. L. Guan** (2005). Identification of FIP200 interaction with the TSC1-TSC2 complex and its role in regulation of cell size control. *J Cell Biol.* 170(3), 379-389.
- Gao X. and D. Pan** (2001). TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev.* 15, 1383-1392.
- Gao G., S. Fernandez, D. Stapleton, A. S. Auster, J. Widmer, J. R. B. Dyck, B. E. Kemp, L. A. Witters** (1996). Non-catalytic γ - and δ -subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 271, 8675-8681.
- Gao G., J. Widmer, D. Stapleton, T. Teh, T. Cox, B. E. Kemp and L. A. Witters** (1995). Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochim Biophys Acta* 1266, 73-82.
- Garami, A., F. J. Zwartkruis, T. Nobukuni, M. Joaquin, M. Rocco, H. Stocker, S. C. Kozma, E. Hafen, J. L. Bos and G. Thomas** (2003). Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP1 signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell.* 11, 1457-1466.
- Gee, J. B. L., A. S. Khandwala and R. W. Bell** (1974). Hexose transport in the alveolar macrophage: Kinetics and pharmacologic features. *J. Reticuloendothel. Soc.* 15, 394-405.
- Gietz R. D. and A. Sugino** (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74(2), 527-534.
- Gwinn D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk and R. J. Shaw** (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 30(2), 214-226.
- Han S., C. Polizzano, G. P. Nielsen, F. J. Hornicek, A. E. Rosenberg and V. Ramesh** (2009). Aberrant hyperactivation of akt and Mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in sporadic chordomas. *Clin Cancer Res.* 15(6), 1940-1946.
- Han J. H., Y. H. Ahn, K. Y. Choi and S. H. Hong** (2009a). Involvement of AMP-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase in 8-Cl-cAMP-induced growth inhibition. *J Cell Physiol.* 218(1), 104-112.
- Han S., R. M. Witt, T. M. Santos, C. Polizzano, B. L. Sabatini and V. Ramesh** (2008). Pam (Protein associated with Myc) functions as an E3 ubiquitin ligase and regulates TSC/mTOR signaling. *Cell Signal.* 20(6), 1084-1091.
- Hanahan D., J. Jessee and F. R. Bloom** (1995). Techniques for transformation of E.coli. In „DNA cloning: a practical approach“. (Ed. D. M. Glover.) pp. 1-36. (IRL Press: Oxford.)

- Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch and K. Yonezawa** (2002). Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. *Cell* 110, 177-189.
- Hara K., K. Yonezawa, Q. P. Weng, M. T. Kozlowski, C. Belham and J. Avruch** (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem.* 273(23), 14484-14494.
- Hardie D. G.** (2008). AMPK and Raptor: matching cell growth to energy supply. *Mol Cell.* 30(3), 263-265.
- Hardie D. G.** (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(10), 774-785.
- Hardie D. G., S. A. Hawley and J. W. Scott** (2006). AMP-activated protein kinase -development of the energy sensor concept. *J Physiol.* 574(Pt 1), 7-15.
- Hardie, D. G.** (2005). New roles for the LKB1 → AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 17(2), 167-173.
- Hardie D. G., J. W. Scott, D. A. Pan and E. R. Hudson** (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 546(1), 113-20.
- Hardie D. G. and S. A. Hawley** (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *Hawley Bioessays* 23(12), 1112-1119.
- Harrington, L. S., G. M. Findlay, A. Gray, T. Tolkacheva, S. Wigfield, H. Rebholz, J. Barnett, N. R. Leslie, S. Cheng, P. R. Shepherd, I. Gout, C. P. Downes and R. F. Lamb** (2004). The TSC1-2 tumour suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* 166, 213-223.
- Harrison C., S. Katayama, S. Dhut, D. Chen, N. Jones, J. Bähler and T. Toda** (2005). SCF(Pof1)-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast. *EMBO J.* 24(3), 599-610.
- Hartman T. R., D. Liu, J. T. Zilfou, V. Robb, T. Morrison, T. Watnick and E. P. Henske** (2009). The tuberous sclerosis proteins regulate formation of the primary cilium via a rapamycin-insensitive and polycystin 1-independent pathway. *Hum Mol Genet.* 18(1), 151-163.
- Hartman T. R., E. Nicolas, A. Klein-Szanto, T. Al-Saleem, T. P. Cash, M. C. Simon and E. P. Henske** (2009a). The role of the Birt-Hogg-Dubé protein in mTOR activation and renal tumorigenesis. *Oncogene.* 28(13), 1594-1604.
- Hartmuth S. and J. Petersen** (2009). Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *J Cell Sci.* 122(11), 1737-1746.
- Harvey K. F., J. Mattila, A. Sofer, F. C. Bennett, M. R. Ramsey, L. W. Ellisen, O. Puig and I. K. Hariharan** (2008). FOXO-regulated transcription restricts overgrowth of Tsc mutant organs. *J Cell Biol.* 180(4), 691-696.
- Hawley S. A., D. A. Pan, K. J. Mustard, L. Ross, J. Bain, A. M. Edelman, B. G. Frenguelli and D. G. Hardie** (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2(1), 9-19.
- Hawley S. A., J. Boudeau, J. L. Reid, K. J. Mustard, L. Udd, T. P. Makela, D. R. Alessi and D. G. Hardie** (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRADA β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2, 28.
- Hawley S. A., M. Davison, A. Woods, S. P. Davies, R. K. Beri, D. Carling and D. G. Hardie** (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271(44), 27879-27887.
- Hayashi T., M. Hatanaka, K. Nagao, Y. Nakaseko, J. Kanoh, A. Kokubu, M. Ebe and M. Yanagida** (2007). Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes Cells* 12(12), 1357-1370.
- Heitman J., N. R. Movva and M. N. Hall** (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253(5022), 905-909.
- Hemminki A., E. Avizienyte, S. Roth, A. Loukola, L. A. Aaltonen, H. Järvinen and A. de la Chapelle** (1998). A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome *Duodecim.* 114(7), 667-668.

- Hengstschläger M., M. Rosner, M. Fountoulakis and G. Lubec** (2005). The cellular response to ectopic overexpression of the tuberous sclerosis genes, TSC1 and TSC2: a proteomic approach. *Int J Oncol.* 27(3), 831-838.
- Hlaváček O., H. Kucerová, K. Harant, Z. Palková and L. Váchová** (2009). Putative role for ABC multidrug exporters in yeast quorum sensing. *FEBS Lett.* 583(7), 1107-1113.
- Ho S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen and L. R. Pease** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77(1), 51-59.
- Hogan D. A.** (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell* 5(4), 613-619.
- Hong S. P. and M. Carlson** (2007). Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *J Biol Chem.* 282(23), 16838-16845.
- Hong S. P., M. Momcilovic and M. Carlson** (2005). Function of mammalian LKB1 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *J Biol Chem.* 280(23), 21804-21809.
- Hong S. P., F. C. Leiper, A. Woods, D. Carling and M. Carlson** (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15), 8839-8843.
- Honigberg S. M. and R. H. Lee** (1998). Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 18(8), 4548-4555.
- Horman S., G. Browne, U. Krause, J. Patel, D. Vertommen, L. Bertrand, A. Lavoinnie, L. Hue, C. Proud and M. Rider** (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol.* 12(16), 1419-1423.
- Hornby J. M., E. C. Jensen, A. D. Lisec, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault and K. W. Nickerson** (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol.* 67(7), 2982-2992.
- Hsu, Y. C., J. J. Chern, Y. Cai, M. Liu and K. W. Choi** (2007). *Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 445, 785-788.
- Huang J., C. C. Dibble, M. Matsuzaki and B. D. Manning** (2008). The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol.* 28(12), 4104-4115.
- Huang, J. and B. D. Manning** (2008a). The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J.* 412(2), 179-190.
- Hudson E. R., D. A. Pan, J. James, J. M. Lucocq, S. A. Hawley, K. A. Green, O. Baba, T. Terashima and D. G. Hardie** (2003). A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol.* 13(10), 861-866.
- Hurley R. L., K. A. Anderson, J. M. Franzone, B. E. Kemp, A. R. Means and L. A. Witters** (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280, 29060-29066.
- Ikeda K., S. Morigasaki, H. Tatebe, F. Tamanoi and K. Shiozaki** (2008). Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell Cycle* 7(3), 358-364.
- Im E., F. C. von Lintig, J. Chen, S. Zhuang, W. Qui, S. Chowdhury, P. F. Worley, G. R. Boss and R. B. Pilz** (2002). Rheb is in a high activation state and inhibits B-Raf kinase in mammalian cells. *Oncogene.* 21(41), 6356-6365.
- Inoki K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada, K. Stankunas, C. Y. Wang, X. He, O. A. MacDougald, M. You, B. O. Williams and K. L. Guan** (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126(5), 955-968.
- Inoki, K., Y. Li, T. Xu and K. Guan** (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17, 1829-1834.
- Inoki K., T. Zhu, K. L. Guan** (2003a). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577-590.

- Inoki, K., Y. Li, T. Zhu, J. Wu and K. L. Guan** (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4, 648-657.
- Iwaki T., Y. Giga-Hama and K. A. Takegawa** (2006). A survey of all 11 ABC transporters in fission yeast: two novel ABC transporters are required for red pigment accumulation in a *Schizosaccharomyces pombe* adenine biosynthetic mutant. *Microbiology* 152, 2309-2321.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su.** (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125-137.
- Jacinto E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall and M. N. Hall** (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 6(11), 1122-1128.
- James M. F., S. Han, C. Polizzano, S. R. Plotkin, B. D. Manning, A. O. Stemmer-Rachamimov, J. F. Gusella and V. Ramesh** (2009). NF2/Merlin is a Novel Negative Regulator of mTOR Complex 1 and Activation of mTORC1 is Associated with Meningioma and Schwannoma Growth. *Mol Cell Biol.* May 18.
- Jiang W., Z. Zhu and H. J. Thompson** (2008). Modulation of the activities of AMP-activated protein kinase, protein kinase B, and mammalian target of rapamycin by limiting energy availability with 2-deoxyglucose. *Mol Carcinog.* 47(8), 616-628.
- Jiang R. and M. Carlson** (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* 10, 3105-3115.
- Jin X., R. Townley and L. Shapiro** (2007). Structural insight into AMPK regulation: ADP comes into play. *Structure* 15(10), 1285-1295.
- Karagiannis J., R. Saleki and P. G. Young** (1999). The pub1 E3 ubiquitin ligase negatively regulates leucine uptake in response to NH₄⁺ in fission yeast. *Curr Genet.* 35(6), 593-601.
- Kato, T., Jr. K. Okazaki, H. Murakami, S. Stettler, P. A. Fantes and H. Okayama** (1996). Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett.* 378, 207-212.
- Kawai, M., A. Nakashima, M. Ueno, T. Ushimaru, K. Aiba, H. Doi and M. Uritani** (2001). Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr. Genet.* 39, 166-174.
- Kemp B. E., J. S. Oakhill and J. W. Scott** (2007). AMPK structure and regulation from three angles. *Structure* 15(10), 1161-1163.
- Kennedy P. J., A. A. Vashisht, K. L. Hoe, D. U. Kim, H. O. Park, J. Hayles and P. Russell** (2008). A genome-wide screen of genes involved in cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicol Sci.* 106(1), 124-139.
- Kinclová O., S. Potier and H. Sychrová** (2002). Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters into two subfamilies. *Microbiology* 148(4), 1225-1232.
- Kim E., P. Goraksha-Hicks, L. Li, T. P. Neufeld and K. L. Guan** (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol.* 10(8), 935-945.
- Kim, d.H., d.D. Sarbassov, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini** (2003). GBL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11, 895-904.
- Kim, d.H., d.D. Sarbassov, A. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini** (2002). mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kimura N., C. Tokunaga, S. Dalal, C. Richardson, K. Yoshino, K. Hara, B. E. Kemp, L. A. Witters, O. Mimura and K. Yonezawa** (2003). A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells* 8(1), 65-79.
- Klebe R. J., J. V. Harriss, Z. D. Sharp and M. G. Douglas** (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25, 333-341.
- Kleymenova E., O. Ibraghimov-Beskrovnaya, H. Kugoh, J. Everitt, H. Xu, K. Kiguchi, G. Landes, P. Harris and C. Walker** (2001). Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene. *Mol Cell.* 7(4), 823-832.

- Klip A., J. D. Schertzer, P. J. Bilan, F. Thong and C. Antonescu** (2009). Regulation of glucose transporter 4 traffic by energy deprivation from mitochondrial compromise. *Acta Physiol (Oxf)* 196(1), 27-35.
- Kobayashi T., O. Minowa, Y. Sugitani, S. Takai, H. Mitani, E. Kobayashi, T. Noda and O. Hino** (2001). A germ-line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(15), 8762-8767.
- Kobayashi T., O. Minowa, J. Kuno, H. Mitani, O. Hino and T. Noda** (1999). Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomas, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice. *Cancer Res.* 59(6), 1206-1211.
- Konrad D., A. Rudich, P. J. Bilan, N. Patel, C. Richardson, L. A. Witters and A. Klip** (2005). Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. *Diabetologia* 48(5), 954-966.
- Kramer J. M., J. T. Davidge, J. M. Lockyer and B. E. Staveley** (2003). Expression of Drosophila FOXO regulates growth and can phenocopy starvation. *BMC Dev Biol.* 3, 5.
- Krause U., L. Bertrand and L. Hue** (2002). Control of p70 ribosomal protein S6 kinase and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein phosphatases in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem.* 269(15), 3751-3759.
- Kuchin S., V. K. Vyas and M. Carlson** (2002). Snf1 protein kinase and the repressors Nrg1 and Nrg2 regulate FLO11, haploid invasive growth, and diploid pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol.* 22(12), 3994-4000.
- Kunz J., R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N. R. Movva and M. N. Hall** (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell.* 73(3), 585-596.
- Lee J. H., H. Koh, M. Kim, Y. Kim, S. Y. Lee, R. E. Karess, S. H. Lee, M. Shong, J. M. Kim, J. Kim and J. Chung** (2007). Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* 21(447), 1017-1020.
- Lee, D. F., H. P. Kuo, C. T. Chen, J. M. Hsu, C. K. Chou, Y. Wei, H. L. Sun, L. Y. Li, B. Ping, W. C. Huang, X. He, J. Y. Hung, C. C. Lai, Q. Ding, J. L. Su, J. Y. Yang, A. A. Sahin, G. N. Hortobagyi, T. J. Tsai, C. H. Tsai and M. C. Hung** (2007a). IKK β suppression of TSC1 links inflammation and tumour angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130, 440-455.
- Leupold U.** (1970). *Methods Cell. Physiol.* 4, 169-177
- Leupold U.** (1955). Methodisches zur Genetik von *Schizosaccharomyces pombe*. *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* 18, 1141-1146.
- Li Y., K. Inoki, P. Vacratsis and K. L. Guan** (2003). The p38 and MK2 kinase cascade phosphorylates tuberin, the tuberous sclerosis 2 gene product, and enhances its interaction with 14-3-3. *J. Biol. Chem.* 278, 13663-13671.
- Li Y., K. Inoki, R. Yeung and K. L. Guan** (2002). Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding. *J. Biol. Chem.* 277, 44593-44596.
- Lichtenberg-Fraté H., J. D. Reid, M. Heyer and M. Höfer** (1996). Functional characterization of *Schizosaccharomyces pombe* genes cloned in potassium transport defective yeast strains. *Folia Microbiol (Praha)* 41(1), 105-106.
- Liu M. Y., S. Cai, A. Espejo, M. T. Bedford and C. L. Walker** (2002). 14-3-3 Interacts with the tumor suppressor tuberin at Akt phosphorylation site(s). *Cancer Res.* 62, 6475-6480.
- Loewith R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe and M. N. Hall** (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell.* 10(3), 457-468.
- Long X., Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa and J. Avruch** (2005). Rheb Binds and Regulates the mTOR Kinase. *Current Biol.* 15, 702-713.
- Longtine M. S., A. McKenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen and J. R. Pringle** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14(10), 953-961.
- Lorenz M. C., N. S. Cutler and J. Heitman** (2000). Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11(1), 183-199.

- Lou D., N. Griffith and D. J. Noonan** (2001). The tuberous sclerosis 2 gene product can localize to nuclei in a phosphorylation-dependent manner. *Mol Cell Biol Res Commun.* 4, 374-380.
- Lyne R., G. Burns, J. Mata, C. J. Penkett, G. Rustici, D. Chen, C. Langford, D. Vetrie and J. Bahler** (2003). Whole-genome microarrays of fission yeast: characteristics, accuracy, reproducibility, and processing of array data. *BMC Genomics* 4, 27.
- Ma L., J. Teruya-Feldstein, P. Bonner, R. Bernardi, D. N. Franz, D. Witte, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi** (2007). Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer Res.* 67(15), 7106-7112.
- Ma L., Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and P. P. Pandolfi** (2005). Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk: Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis. *Cell* 121, 179-193.
- Mach, K. E., K. A. Furge and C. F. Albright** (2000). Loss of Rhb1, a Rheb-related GTPase in fission yeast, causes growth arrest with a terminal phenotype similar to that caused by nitrogen starvation. *Genetics* 155, 611-622.
- Maddika S., S. R. Ande, S. Panigrahi, T. Paranjothy, K. Weglarczyk, A. Zuse, M. Eshraghi, K. D. Manda, E. Wiechec and M. Los** (2007). Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 10(1-2), 13-29.
- Madrid M., T. Soto, H. K. Khong, A. Franco, J. Vicente, P. Pérez, M. Gacto, J. Cansado** (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 281(4), 2033-2043.
- Malanchuk O. M., V. Pozur, G. G. Panasyuk, I. O. Nemazanyy, V. V. Filonenko, I. T. Gout and S. S. Palchevsky** (2005). Identification of novel binding partners for tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) by yeast two-hybrid approach. *Exp. Oncol.* 27, 186-190.
- Manning B. D., M. N. Logsdon, A. I. Lipovsky, D. Abbott, D. J. Kwiatkowski and L. C. Cantley** (2005). Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. *Genes Dev.* 19(15), 1773-1778.
- Manning, B. D., A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis and L. C. Cantley** (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* 10, 151-162.
- Matsumoto, S., A. Bandyopadhyay, D. J. Kwiatkowski, U. Maitra and T. Matsumoto** (2002). Role of the Tsc1-Tsc2 complex in signaling and transport across the cell membrane in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 161, 1053-1063.
- Matsuo T., Y. Otsubo, J. Urano, F. Tamanoi and M. Yamamoto** (2007). Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Mol Cell Biol.* 27(8), 3154-3164.
- Matsuo, T., Y. Kubo, Y. Watanabe and M. Yamamoto** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *EMBO J* 22, 3073-3083.
- Matsusaka T., D. Hirata, M. Yanagida and T. Toda** (1995). A novel protein kinase gene *ssp1⁺* is required for alteration of growth polarity and actin localization in fission yeast. *EMBO J.* 14(14), 3325-3338.
- McCartney R. R. and M. C. Schmidt** (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J. Biol. Chem.* 276, 36460-36466.
- McGee S. L., B. J. van Denderen, K. F. Howlett, J. Mollica, J. D. Schertzer, B. E. Kemp and M. Hargreaves** (2008). AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* 57(4), 860-867.
- Megnet R.** (1965). Effect of 2-deoxyglucose on *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* 90(4), 1032-1035.
- Miloloza A., M. Rosner, M. Nellist, D. Halley, G. Bernaschek and M. Hengstschläger** (2000). The TSC1 gene product, hamartin, negatively regulates cell proliferation. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1721-1727.
- Miranda-Saavedra D., M. J. Stark, J. C. Packer, C. P. Vivares, C. Doerig and G. J. Barton** (2007). The complement of protein kinases of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* in relation to those of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics* 8, 309.

- Mitchell K. I., B. J. Michell, C. M. House, D. Stapleton, J. Dyck, J. Gamble, C. Ullrich, L. A. Witters and B. E. Kemp** (1997). Posttranslational modifications of the 5'-AMP-activated protein kinase beta1 subunit. *J Biol Chem.* 272(39), 24475-24479.
- Mitchell K. I., D. Stapleton, G. Gao, C. House, B. Michell, F. Katsis, L. A. Witters and B. E. Kemp** (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem* 269, 2361-2364.
- Mochizuki N. and M. Yamamoto** (1992). Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet.* 233(1-2), 17-24.
- Moon R. T., A. D. Kohn, G. V. de Ferrari and A. Kaykas** (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 5(9), 691-701.
- Mostov K. E.** (2006). mTOR is out of control in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(14), 5247-5248.
- Mueller P. P. and A. G. Hinnebusch** (1986). Multiple upstream AUG codons mediate translational control of GCN4. *Cell* 45(2), 201-207.
- Mukkada, A. J. and P. F. Bonventre** (1975). Membrane transport by mouse and guinea pig macrophages: characteristics of the glucose transport system. *J. Reticuloendothel. Soc.* 17, 20-29.
- Murthy V., S. Han, R. L. Beauchamp, N. Smith, L. A. Haddad, N. Ito and V. Ramesh** (2004). Pam and Its Ortholog Highwire Interact with and May Negatively Regulate the TSC1/TSC2 Complex. *J. Biol. Chem.* 279, 1351-1358.
- Nakase, Y., K. Fukuda, Y. Chikashige, C. Tsutsumi, D. Morita, S. Kawamoto, M. Ohnuki, Y. Hiraoka and T. Matsumoto** (2006). A defect in protein farnesylation suppresses a loss of *Schizosaccharomyces pombe tsc2⁺*, a homolog of the human gene predisposing to tuberous sclerosis complex. *Genetics* 173, 569-578.
- Nakashima A., K. Yoshino, T. Miyamoto, S. Eguchi, N. Oshiro, U. Kikkawa and K. Yonezawa** (2007). Identification of TBC7 having TBC domain as a novel binding protein to TSC1-TSC2 complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(1), 218-223.
- Nath N., R. R. McCartney and M. C. Schmidt** (2003). Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol Cell Biol.* 23(11), 3909-3917.
- Nath N., R. R. McCartney and M. C. Schmidt** (2002). Purification and characterization of Snf1 kinase complexes containing a defined Betasubunit composition. *J Biol Chem.* 277(52), 50403-50408.
- Nauli S. M., F. J. Alenghat, Y. Luo, E. Williams, P. Vassilev, X. Li, A. E. Elia, W. Lu, E. M. Brown, S. J. Quinn, D. E. Ingber and J. Zhou** (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 33(2), 129-137.
- Nawrocki A., S. J. Fey, A. Goffeau, P. Roepstorff and P. M. Larsen** (2001). The effects of transcription regulating genes PDR1, pdr1-3 and PDR3 in pleiotropic drug resistance. *Proteomics* 1(8), 1022-1032.
- Nellist M., M. A. Goedbloed, C. de Winter, B. Verhaaf, A. Jankie, A. J. J. Reuser, A. M. W. van den Ouweland, P. van der Sluijs and D. J. Halley** (2002). Identification and characterization of the interaction between tuberin and 14-3-3 ϕ . *J. Biol. Chem.* 277, 39417-39424.
- Neshat M. S., I. K. Mellinghoff, C. Tran, B. Stiles, G. Thomas, R. Petersen, P. Frost, J. J. Gibbons, H. Wu and C. L. Sawyers** (2001). Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(18), 10314-10319.
- Nobukuni T., M. Joaquin, M. Roccio, S. G. Dann, S. Y. Kim, P. Gulati, M. P. Byfield, J. M. Backer, F. Natt, J. L. Bos, F. J. Zwartkruis and G. Thomas** (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(40), 14238-14243.
- Nojima H., C. Tokunaga, S. Eguchi, N. Oshiro, S. Hidayat, K. Yoshino, K. Hara, N. Tanaka, J. Avruch, K. Yonezawa** (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem.* 278(18), 15461-15464.
- Obsilová V., J. Silhan, E. Boura, J. Teisinger and T. Obsil** (2008). 14-3-3 proteins: a family of versatile molecular regulators. *Physiol Res.* 57 Suppl 3, 11-21.

- Oh K. B., H. Miyazawa, T. Naito and H. Matsuoka** (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8), 4664-4668.
- Okazaki K., N. Okazaki, K. Kume, S. Jinno, K. Tanaka and H. Okayama** (1990). High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 18(22), 6485-6489.
- Oldham S., J. Montagne, T. Radimerski, G. Thomas and E. Hafen** (2000). Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev.* 14(21), 2689-2694.
- Onda H., A. Lueck, P. W. Marks, H. B. Warren and D. J. Kwiatkowski** (1999). Tsc2(+/-) mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background. *J Clin Invest.* 104(6), 687-695.
- Orlova M., E. Kanter, D. Krakovich and S. Kuchin** (2006). Nitrogen availability and TOR regulate the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 5(11), 1831-1837.
- Oshiro N., R. Takahashi, K. Yoshino, K. Tanimura, A. Nakashima, S. Eguchi, T. Miyamoto, K. Hara, K. Takehana, J. Avruch, U. Kikkawa and K. Yonezawa** (2007). The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem.* 282(28), 20329-20339.
- Otsubo Y. and M. Yamamoto** (2008). TOR signaling in fission yeast. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 43(4), 277-283.
- Ouchi N., R. Shibata and K. Walsh** (2005). AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. *Circ Res.* 96(8), 838-846.
- Paik J. H., R. Kollipara, G. Chu, H. Ji, Y. Xiao, Z. Ding, L. Miao, Z. Tothova, J. W. Horner, D. R. Carrasco, S. Jiang, D. G. Gilliland, L. Chin, W. H. Wong, D. H. Castrillon and R. A. DePinho** (2007). FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell.* 128(2), 309-323.
- Pan D. A. and D. G. Hardie** (2002). A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. *Biochem J.* 1(367), 179-86.
- Patel, P. H., N. Thapar, L. Guo, M. Martinez, J. Maris, C. L. Gau, J. A. Lengyel and F. Tamanoi** (2003). *Drosophila* Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. *J. Cell Sci.* 116, 3601-3610.
- Patursky-Polischuk I., M. Stolovich-Rain, M. Hausner-Hanochi, J. Kasir, N. Cybulski, J. Avruch, M. A. Ruegg, M. N. Hall and O. Meyuhas** (2009). The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol Cell Biol.* 29(3), 640-649.
- Pelletier A., E. Joly, M. Prentki and L. Coderre** (2005). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes. *Endocrinology* 146(5), 2285-2294.
- Petersen J. and P. Nurse** (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat Cell Biol.* 9(11), 1263-1272.
- Peterson R. T., P. A. Beal, M. J. Comb and S. L. Schreiber** (2000). FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem.* 275(10), 7416-7423.
- Plank, T. L., R. S. Yeung and E. P. Henske** (1998). Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberlin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer Res.* 58, 4766-4770.
- Platara M., A. Ruiz, R. Serrano, A. Palomino, F. Moreno and J. Arino** (2006). The transcriptional response of the yeast Na(+)-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* 281, 36632-36642.
- Podsypanina K., R. T. Lee, C. Politis, I. Hennessy, A. Crane, J. Puc, M. Neshat, H. Wang, L. Yang, J. Gibbons, P. Frost, V. Dreisbach, J. Blenis, Z. Gaciong, P. Fisher, C. Sawyers, L. Hedrick-Ellenson and R. Parsons** (2001). An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten^{+/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(18), 10320-10325.
- Polekhina G., A. Gupta, B. J. Michell, B. van Denderen, S. Murthy, S. C. Feil, I. G. Jennings, D. J. Campbell, L. A. Witters, M. W. Parker, B. E. Kemp and D. Stapleton** (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycolysis. *Curr Biol.* 13(10), 867-871.

- Pollizzi K., I. Malinowska-Kolodziej, C. Doughty, C. Betz, J. Ma, J. Goto and D. J. Kwiatkowski** (2009). A hypomorphic allele of Tsc2 highlights the role of TSC1/TSC2 in signaling to AKT and models mild human TSC2 alleles. *Hum Mol Genet.* 18(13), 2378-23787.
- Potter, C. J., L. G. Pedraza and T. Xu** (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat. Cell Biol.* 4, 658-665.
- Potter C. J., H. Huang and T. Xu** (2001). Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 105, 357-368.
- Prévéral S., L. Gayet, C. Moldes, J. Hoffmann, S. Mounicou, A. Gruet, F. Reynaud, R. Lobinski, J. M. Verbavatz, A. Vavasseur and C. Forestier** (2009). A common highly conserved cadmium detoxification mechanism from bacteria to humans: heavy metal tolerance conferred by the ATP-binding cassette (ABC) transporter SpHMT1 requires glutathione but not metal-chelating phytochelatin peptides. *J Biol Chem.* 284(8), 4936-4943.
- Pruznak A. M., A. A. Kazi, R. A. Frost, T. C. Vary and C. H. Lang** (2008). Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose nucleoside prevents leucine-stimulated protein synthesis in rat skeletal muscle. *J Nutr.* 138(10), 1887-1884.
- Puig O., F. Caspary, G. Rigaut, B. Rutz, E. Bouveret, E. Bragado-Nilsson, M. Wilm and B. Séraphin** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24(3), 218-229.
- Qin S. and G. W. de Vries** (2008). $\alpha 2$ But not $\alpha 1$ AMP-activated protein kinase mediates oxidative stress-induced inhibition of retinal pigment epithelium cell phagocytosis of photoreceptor outer segments. *J Biol Chem.* 283(11), 6744-6751.
- Ramage G., S. P. Saville, B. L. Wickes and J. L. López-Ribot** (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol.* 68(11), 5459-5463.
- Robzyk K. and Y. Kassir** (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic. Acids. Res.* 20, 3790.
- Roccio M., J. L. Bos and F. J. Zwartkruis** (2006). Regulation of the small GTPase Rheb by amino acids. *Oncogene* 25(5), 657-664.
- Rosenthal G. A.** (1977). The biological effects and mode of action of L-canavanine, a structural analogue of L-arginine. *Q Rev Biol.* 52(2), 155-178.
- Rosner M., M. Hanneder, N. Siegel, A. Valli and M. Hengstschläger** (2008). The tuberous sclerosis gene products hamartin and tuberin are multifunctional proteins with a wide spectrum of interacting partners. *Mutat Res.* 658(3), 234-246.
- Rosner M., A. Freilinger, M. Hengstschläger** (2007). Akt regulates nuclear/cytoplasmic localization of tuberin. *Oncogene* 25;26(4), 521-531.
- Rosner M., A. Freilinger, M. Hanneder, N. Fujita, G. Lubec, T. Tsuruo and M. Hengstschläger** (2007a). p27KIP1 localization depends on the tumor suppressor protein tuberin. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1541-1556.
- Rosner M., A. Freilinger, G. Lubec and M. Hengstschläger** (2005). The tuberous sclerosis genes, TSC1 and TSC2, trigger different gene expression responses. *Int J Oncol.* 27(5), 1411-1424.
- Rosner M. and M. Hengstschläger** (2004). Tuberin binds p27 and negatively regulates its interaction with the SCF component Skp2. *J. Biol. Chem.* 279, 48707-48715.
- Rothstein R. J.** (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101, 202-211.
- Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi and J. Blenis** (2004). Tumour-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumour suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13489-13494.
- Ruvinsky I., N. Sharon, T. Lerer, H. Cohen, M. Stolovich-Rain, T. Nir, Y. Dor, P. Zisman and O. Meyuhas** (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* 19(18), 2199-2211.
- Ryu D., K. J. Oh, H. Y. Jo, S. Hedrick, Y. N. Kim, Y. J. Hwang, T. S. Park, J. S. Han, C. S. Choi, M. Montminy, S. H. Koo** (2009). TORC2 regulates hepatic insulin signaling via a mammalian phosphatidic acid phosphatase, LIPIN1. *Cell Metab.* 9(3), 240-251.

- Saal N.** (2005). Untersuchungen potentieller Aminosäure-Transporter in der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- Sakamoto K., E. Zarrinpashneh, G. R. Budas, A. C. Pouleur, A. Dutta, A. R. Prescott, A. Ashworth, A. Jovanovic, D. R. Alessi and L. Bertrand** (2006). Deficiency of LKB1 in heart prevents ischemia-mediated activation of AMPK α 2 but not AMPK α 1. *Am J Physiol* 290, 780-788.
- Sakamoto K., A. McCarthy, D. Smith, K. A. Green, D. G. Hardie, A. Ashworth and D. R. Alessi** (2005). Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction. *EMBO J* 24, 1810-1820.
- Salt I. P., G. Johnson, S. J. Ashcroft and D. G. Hardie** (1998). AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic cells, and may regulate insulin release. *Biochem J.* 335, 533-539.
- Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). „Molecular Cloning - A Laboratory Manual.“ 2nd Edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.)
- Sampson J. R., M. M. Maheshwar, R. Aspinwall, P. Thompson, J. P. Cheadle, D. Ravine, S. Roy, E. Haan, J. Bernstein and P. C. Harris** (1997). Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet.* 61(4), 843-851.
- Sancak Y. and D. M. Sabatini** (2009). Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling. *Biochem Soc Trans.* 37(1), 289-290.
- Sancak Y., T. R. Peterson, Y. D. Shaul, R. A. Lindquist, C. C. Thoreen, L. Bar-Peled and D. M. Sabatini** (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320(5882), 1496-1501.
- Sancak Y., C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr and D. M. Sabatini** (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 25(6), 903-915.
- Sanders M. J., P. O. Grondin, B. D. Hegarty, M. A. Snowden and D. Carling** (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J.* 403(1), 139-48.
- Sarbassov D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini** (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307(5712), 1098-1101.
- Sarbassov D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini** (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 14(14), 1296-1302.
- Sato T., A. Nakashima, L. Guo and F. Tamanoi** (2009). Specific activation of mTORC1 by Rheb G-protein in vitro involves enhanced recruitment of its substrate protein. *J Biol Chem.* 284(19), 12783-12791.
- Sato M., S. Dhut and T. Toda** (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22(7), 583-591.
- Sato S., H. Suzuki, U. Widyastuti, Y. Hotta and S. Tabata** (1994). Identification and characterization of genes induced during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet.* 26(1), 31-37.
- Saucedo L. J., X. Gao, D. A. Chiarelli, L. Li, D. Pan and B. A. Edgar** (2003). Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat. Cell Biol.* 5, 566-571.
- Scott J. W., S. A. Hawley, K. A. Green, M. Anis, G. Stewart, G. A. Scullion, D. G. Norman and D. G. Hardie** (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest.* 113(2), 274-284.
- Seufert W. and S. Jentsch** (1990). Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *The EMBO Journal* 9(2), 543-550.
- Shah, O. J., Z. Wang and T. Hunter** (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival defects. *Curr. Biol.* 14, 1650-1656.
- Shaw R. J., M. Kosmatka, N. Bardeesy, R. L. Hurley, L. A. Witters, R. A. DePinho and L. C. Cantley** (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3329-3335.
- Shaw R. J., N. Bardeesy, B. D. Manning, L. Lopez, M. Kosmatka, R. A. DePinho and L. C. Cantley** (2004a). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6(1), 91-99.

- Shepherd, P.R., D.J. Withers and K. Siddle** (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* 333, 471-490.
- Sherr C. J.** (2000-2001). Cell cycle control and cancer. *Harvey Lect.* 96, 73-92.
- Shevchenko A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
- Shillingford J. M., N. S. Murcia, C. H. Larson, S. H. Low, R. Hedgepeth, N. Brown, C. A. Flask, A. C. Novick, D. A. Goldfarb, A. Kramer-Zucker, G. Walz, K. B. Piontek, G. G. Germino and T. Weimbs** (2006). The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(14), 5466-5471.
- Shiozaki K. and P. Russell** (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378(6558), 739-743.
- Shumway S. D., Y. Li and Y. Xiong** (2003). 14-3-3 β Binds to and negatively regulates the tuberous sclerosis complex (TSC2) tumor suppressor gene product, tuberin. *J. Biol. Chem.* 278, 2089-2092.
- Smith E. M., S. G. Finn, A. R. Tee, G. J. Browne and C. G. Proud** (2005). The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *J Biol Chem.* 280(19), 18717-18727.
- Smith D. A., W. M. Toone, D. Chen, J. Bahler, N. Jones, B. A. Morgan and J. Quinn** (2002). The *Srk1* protein kinase is a target for the *Sty1* stress-activated MAPK in fission yeast. *J Biol Chem.* 277(36), 33411-33421.
- Soldatenkov V. A., J. A. Velasco, M. A. Avila, A. Dritschilo and V. Notario** (1995). Isolation and characterization of *SpTRK*, a gene from *Schizosaccharomyces pombe* predicted to encode a K⁺ transporter protein. *Gene* 161(1), 97-101.
- Soucek T., M. Rosner, A. Miloloza, M. Kubista, J. P. Cheadle, J. R. Sampson and M. Hengstschläger** (2001). Tuberous sclerosis causing mutants of the TSC2 gene product affect proliferation and p27 expression. *Oncogene* 20(35), 4904-4909.
- Soucek T., R. S. Yeung and M. Hengstschläger** (1998). Inactivation of the cyclindependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15653-15658.
- Soucek T., O. Pusch, R. Wienecke, J.E. DeClue and M. Hengstschläger** (1997). Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. *J. Biol. Chem.* 272, 29301-29308.
- Stiefel J., L. Wang, D. A. Kelly, R. T. Janoo, J. Seitz, S. K. Whitehall and C. S. Hoffman** (2004). Suppressors of an adenylate cyclase deletion in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 3(3), 610-619.
- Stocker H., T. Radimerski, B. Schindelholz, F. Wittwer, P. Belawat, P. Daram, S. Breuer, G. Thomas and E. Hafen** (2003). Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 5, 559-565.
- Suryawan A., A. S. Jeyapalan, R. A. Orellana, F. A. Wilson, H. V. Nguyen and T. A. Davis** (2008). Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295(4), 868-875.
- Suryawan A., R. A. Orellana, H. V. Nguyen, A. S. Jeyapalan, J. R. Fleming and T. A. Davis** (2007). Activation by insulin and amino acids of signaling components leading to translation initiation in skeletal muscle of neonatal pigs is developmentally regulated. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293(6), 1597-1605.
- Suter M., U. Riek, R. Tuerk, U. Schlattner, T. Wallimann and D. J. Neumann** (2006). Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *Biol Chem.* 281(43), 32207-32216.
- Sutherland C. M., S. A. Hawley, R. R. McCartney, A. Leech, M. J. Stark, M. C. Schmidt and D. G. Hardie** (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol.* 13(15), 1299-1305.
- Tabancay A. P. Jr, C. L. Gau, I. M. Machado, E. J. Uhlmann, D. H. Gutmann, L. Guo and F. Tamanoi** (2003). Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *J Biol Chem.* 278(41), 39921-39930.
- Tapon, N., N. Ito, B. J. Dickson, J. E. Treisman and I. K. Hariharan** (2001). The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell.* 105(3), 345-355.

- Tee, A. R., J. Blenis and C. G. Proud** (2005) Analysis of mTOR signaling by the small G-proteins, Rheb and RhebL1. *FEBS Lett.* 579, 4763-4768.
- Tee A. R., B. D. Manning, P. P. Roux, L. C. Cantley and J. Blenis** (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, tuberin and hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol.* 13, 1259-1268.
- Tee, A. R., R. Anjum and J. Blenis** (2003a). Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *J. Biol. Chem.* 278, 37288-37296.
- Teleman A. A., Y. W. Chen and S. M. Cohen** (2005). *Drosophila* Melted modulates FOXO and TOR activity. *Dev Cell* 9(2), 271-281.
- Tetsu O. and F. McCormick** (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398(6726), 422-426.
- Thompson-Jaeger S., J. François, J. P. Gaughran and K. Tatchell** (1991). Deletion of SNF1 affects the nutrient response of yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. *Genetics* 129(3), 697-706.
- Toda T., S. Dhut, G. Superti-Furga, Y. Gotoh, E. Nishida, R. Sugiura and T. Kuno** (1996). The fission yeast *pmk1⁺* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol.* 16(12), 6752-6764.
- Townley R. and L. Shapiro** (2007). Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. *Science* 315(5819), 1726-1729.
- Urano J., T. Sato, T. Matsuo, Y. Otsubo, M. Yamamoto and F. Tamanoi** (2007). Point mutations in TOR confer Rheb-independent growth in fission yeast and nutrient-independent mammalian TOR signaling in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9), 3514-3519.
- Urano, J., M. J. Comiso, L. Guo, P. J. Aspuria, R. Deniskin, A. P. Tabancay, J. Kato-Stankiewicz and F. Tamanoi** (2005). Identification of novel single amino acid changes that result in hyperactivation of the unique GTPase, Rheb, in fission yeast. *Mol Microbiol* 58, 1074-1086.
- Urano J., A. P. Tabancay, W. Yang and F. Tamanoi** (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Rheb G-protein is involved in regulating canavanine resistance and arginine uptake. *J Biol Chem.* 275(15), 11198-11206.
- Uritani, M., H. Hidaka, Y. Hotta, M. Ueno, T. Ushimaru and T. Toda** (2006). Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes Cells* 11, 1367-1379.
- van Slegtenhorst M., D. Khabibullin, T. R. Hartman, E. Nicolas, W. D. Kruger and E. P. Henske** (2007). The Birt-Hogg-Dube and tuberous sclerosis complex homologs have opposing roles in amino acid homeostasis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 282(34), 24583-24590.
- van Slegtenhorst, M., A. Mustafa and E. P. Henske** (2005). Pas1, a G1 cyclin, regulates amino acid uptake and rescues a delay in G1 arrest in Tsc1 and Tsc2 mutants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Hum Mol Genet* 14, 2851-2858.
- van Slegtenhorst, M., E. Carr, R. Stoyanova, W. D. Kruger and E. P. Henske** (2004). Tsc1⁺ and tsc2⁺ regulate arginine uptake and metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 279, 12706-12713.
- van Slegtenhorst, M., M. Nellist, B. Nagelkerken, J. Cheadle, R. Snell, A. van den Ouweland, A. Reuser, J. Sampson, D. Halley and P. van der Sluijs** (1998). Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1053-1057.
- Vander Haar E., S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D. H. Kim** (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 9(3), 316-323.
- Vary T. C.** (2007). Acute oral leucine administration stimulates protein synthesis during chronic sepsis through enhanced association of eukaryotic initiation factor 4G with eukaryotic initiation factor 4E in rats. *J Nutr.* 137(9), 2074-2079.
- Vieira J. and J. Messing** (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* 100, 189-194.
- Wang L., T. E. Harris, R. A. Roth and J.C. Lawrence** (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem.* 282(27), 20036-20044.

- Wang X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi and C. G. Proud** (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 20(16), 4370-4379.
- Warden S. M., C. Richardson, J. O'Donnell Jr, D. Stapleton, B. E. Kemp and L. A. Witters** (2001). Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J.* 354, 275-283.
- Weimbs T.** (2006). Regulation of mTOR by polycystin-1: is polycystic kidney disease a case of futile repair? *Cell Cycle.* 5(21), 2425-2429.
- Weisman R., I. Roitburg, M. Schonbrun, R. Harari and M. Kupiec** (2007). Opposite effects of tor1 and tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics* 175(3), 1153-1162.
- Weisman, R., I. Roitburg, M. Schonburn, R. Harari and M. Kupiec** (2006). Opposite effects of Tor1 and Tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics* 175, 1153-1162.
- Weisman, R., I. Roitburg, T. Nahari and M. Kupiec** (2005). Regulation of leucine uptake by *tor1*⁺ in *Schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. *Genetics* 169, 539-550.
- Weisman R. and M. Choder** (2001). The fission yeast TOR homolog, *tor1*⁺, is required for the response to starvation and other stresses via a conserved serine. *J Biol Chem.* 276(10), 7027-7032.
- Weisman, R., M. Choder and Y. Koltin** (1997). Rapamycin specifically interferes with the developmental response of fission yeast to starvation. *J Bacteriol* 179, 6325-6334.
- Wilson P. D.** (2004). Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* (10), 1868-1873.
- Wilson W. A., S. A. Hawley and D. G. Hardie** (1996). Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol.* 6(11):1426-34.
- Wodarz A. and R. Nusse** (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14, 59-88.
- Wong K. A. and H. F. Lodish** (2006). A revised model for AMP-activated protein kinase structure: The alpha-subunit binds to both the beta- and gamma-subunits although there is no direct binding between the beta- and gamma-subunits. *J Biol Chem.* 281(47), 36434-36442.
- Woods A., K. Dickerson, R. Heath, S. P. Hong, M. Momcilovic, S. R. Johnstone, M. Carlson and D. Carling** (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21-33.
- Woods A., S. R. Johnstone, K. Dickerson, F. C. Leiper, L. G. Fryer, D. Neumann, U. Schlattner, T. Wallimann, M. Carlson and D. Carling** (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13, 2004-2008.
- Woods A., P. C. Cheung, F. C. Smith, M. D. Davison, J. Scott, R. K. Beri and D. Carling** (1996). Characterization of AMP-activated protein kinase and subunits. Assembly of the heterotrimeric complex *in vitro*. *J Biol Chem* 271, 10282-10290.
- Woods A., M. R. Munday, J. Scott, X. Yang, M. Carlson and D. Carling** (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. *J Biol Chem.* 269(30), 19509-19515.
- Xi X., J. Han J. Z. Zhang** (2001). Stimulation of glucose transport by AMP-activated protein kinase via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 276(44), 41029-41034.
- Yaffe M. B.** (2002) How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 513(1), 53-57.
- Yamamoto Y., K. A. Jones, B. C. Mak, A. Muehlenbachs and R. S. Yeung** (2002). Multicompartmental distribution of the tuberous sclerosis gene products, hamartin and tuberlin. *Arch. of Biochem. and Biophys.* 404, 210-217.
- Yang, Q., K. Inoki, T. Ikenoue and K. L. Guan** (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 20, 2820-2832.
- Yang W, A. P. Jr. Tabancay, J. Urano, F. Tamanoi** (2001). Failure to farnesylate Rheb protein contributes to the enrichment of G₀/G₁ phase cells in the *Schizosaccharomyces pombe* farnesyltransferase mutant. *Mol Microbiol.* 41(6), 1339-1347.

- Yang X., R. Jiang and M. Carlson** (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J.* 13, 5878-5886.
- Yang X., E. J. A. Hubbard and M. Carlson** (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* 257, 680-682.
- Yanisch-Perron C., J. Vieira and J. Messing** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33(1), 103-119.
- Ye T., K. Elbing and S. Hohmann** (2008). The pathway by which the yeast protein kinase Snf1p controls acquisition of sodium tolerance is different from that mediating glucose regulation. *Microbiology* 154(9), 2814-2826.
- Yoder B. K., X. Hou and L. M. Guay-Woodford** (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol.* 13(10), 2508-2516.
- Zacharek S.J., Y. Xiong and S.D. Shumway** (2005). Negative regulation of TSC1-TSC2 by mammalian D-type cyclins. *Cancer Res.* 65, 11354-11360.
- Zhang, H., N. Bajraszewski, E. Wu, H. Wang, A. P. Moseman, S. L. Dabora, J. D. Griffin and D. Kwiatkowski** (2007). PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. *J. Clin. Invest.* 117, 730-738.
- Zhang H. H., A. I. Lipovsky, C. C. Dibble, M. Sahin and B. D. Manning** (2006). S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. *Mol Cell* 24(2), 185-197.
- Zhang W., S. Patil, B. Chauhan, S. Guo, D. R. Powell, J. Le, A. Klotsas, R. Matika, X. Xiao, R. Franks, K. A. Heidenreich, M. P. Sajan, R. V. Farese, D. B. Stolz, P. Tso, S. H. Koo, M. Montminy and T. G. Unterman** (2006a). FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *J Biol Chem.* 281(15), 10105-10117.
- Zhang, Y., X. Gao, L. J. Saucedo, B. Ru, B. A. Edgar and D. Pan** (2003). Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat. Cell Biol.* 5, 578-581.
- Zhang X., J. P. Gaspard and D. C. Chung** (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 61(16), 6050-6054.
- Zhang H., J. P. Stallock, J. C. Ng, C. Reinhard and T. P. Neufeld** (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev.* 14(21), 2712-2724.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Schaubitzer, Kerstin
Geburtsdatum /-ort: 07. Februar 1980 in Dresden
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Akademische Ausbildung

seit 11/2004 Promotion an der Universität Osnabrück - Fachbereich Biologie
Zellbiologie niederer Eukaryoten (SFB 431 - Nachwuchsgruppe)
Thema der Dissertation: „Untersuchungen zur Regulation des Tsc1-/ Tsc2
Komplexes in *Schizosaccharomyces pombe*“

10/2004 Universitätsabschluss als Diplom-Biologin an der Ernst-Moritz-Arndt
Universität in Greifswald
Thema der Diplomarbeit: „Induktion von generellen und spezifischen
Stressgenen in *Bacillus licheniformis*“

10/1999 - 10/2004 Biologiestudium an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald

Schulbildung

06/1998 Abitur am Staatlichen Gymnasium Fridericianum Rudolstadt

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank und Respekt all jenen entgegenbringen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. A. Lorberg für die Bereitstellung der guten Arbeitsbedingungen, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben. Für die große Geduld, den Hilfestellungen bei vielen Versuchen und das Lesen dieser Arbeit möchte ich ebenfalls Dr. A. Lorberg danken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. J. Heinisch für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation. Auch Dr. K. Jahreis und Prof. Dr. A. Paululat möchte ich mich für die Bereitschaft, als Prüfer zu fungieren, bedanken.

Des Weiteren gilt meine Anerkennung an die Laborcrew der Genetik und der Biochemie für die kompetente wissenschaftliche Hilfe und der angenehmen Arbeitsatmosphäre. Ebenfalls danke ich den Arbeitsgruppen, dass ich die Geräte nutzen durfte. Unvergesslich bleiben auch die Weihnachtsfeiern der Genetik - Crew.

Ganz besonders möchte ich mich bei Mareike und Nadine bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und stets für mich da waren. Gesa danke ich besonders, dass sie immer hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite stand und es schaffte mich im Laboralltag immer wieder aufzubauen.

Ein großer Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich über all die Jahre nach besten Kräften unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei Thomas bedanken, der mir während der gesamten Zeit einen enormen Rückhalt bot und es immer schaffte, dass ich meine Sorgen wenigstens für kurze Zeit vergaß. Seine große Geduld, die er insbesondere während der Schreibphase aufbrachte, verdient meine Bewunderung.

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen unentgeltlich geholfen.

1. Die „Northern - Blot“ - Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Anne Dierkes (Abteilung SFB 431 - Nachwuchsgruppe, Fachbereich Biologie/Chemie, Universität Osnabrück).

Weitere Personen waren an der inhaltlichen materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)