

Charakterisierung der TOR-Komplexe in
Schizosaccharomyces pombe

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Biologie/Chemie
der Universität Osnabrück

von

Gesa von Coelln

Osnabrück, Oktober 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Zusammenfassung	6
2 Summary.....	7
3 Einleitung.....	8
3.1 Die TOR-Proteine.....	8
3.2 Der TOR-Signaltransduktionsweg in Säugern und der Bäckerhefe <i>S. cerevisiae</i>	9
3.2.1 Die TOR-Komplexe	9
3.2.1.1 Der TOR-Komplex 1	9
3.2.1.1.1 Die TOR-Komplex 1-Mitglieder	10
3.2.1.2 Der TOR-Komplex 2	16
3.2.1.2.1 Die mTOR-Komplex 2-Mitglieder	16
3.2.2 Regulation von mTOR.....	19
3.2.2.1 Aktivierung des TOR-Komplex 1 durch Wachstumsfaktoren.....	20
3.2.2.2 Aktivierung des TOR-Komplex 1 durch Nährstoffe	20
3.2.2.3 Aktivierung des TOR-Komplex 1 durch einen hohen Energiestatus.....	21
der Zelle	21
3.2.2.4 Inaktivierung des TOR-Komplex 1 unter Stressbedingungen	21
3.2.3 Bedeutung von AGC-Kinasen in dem TOR-Signalweg.....	22
3.2.4 Lokalisierung der TOR-Komplexe.....	23
3.3 Der TOR-Signaltransduktionsweg in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	24
3.3.1 <i>S. pombe</i> als Modellorganismus	24
3.3.2 Der TOR-Weg in <i>S. pombe</i>	25
3.3.3 Zielproteine von SpTOR	29
3.3.3.1 Das SpTor1-Zielprotein SpGad8	29
3.4 Rapamycin.....	29
3.5 Ziel der Arbeit	32
4 Material und Methoden	33
4.1 Materialien.....	33
4.1.1 Chemikalien.....	33
4.1.2 Enzyme	34
4.1.3 Antikörper.....	35
4.1.4 Oligonukleotide	36
4.1.5 Plasmide.....	40
4.2 Stämme und Medien.....	46
4.2.1 Bakterien-Stämme und -Medien.....	46
4.2.1.1 <i>E. coli</i> Stamm.....	46
4.2.1.2 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	47
4.2.1.3 Lagerung von <i>E. coli</i> Stämmen.....	47
4.2.2 Hefestämme	47
4.2.2.1 <i>S. cerevisiae</i> Stämme	47
4.2.2.2 Medien zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	48
4.2.2.3 Lagerung von <i>S. cerevisiae</i> Stämmen.....	48
4.2.2.4 <i>S. pombe</i> Stämme.....	49
4.2.2.5 Medien zur Anzucht von <i>S. pombe</i> -Zellen	51
4.2.2.6 Lagerung von <i>S. pombe</i> -Stämmen	52
4.3 Methoden.....	53
4.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. pombe</i>	53
4.3.2 Amplifikation von DNA.....	53

4.3.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	55
4.3.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	55
4.3.5	Reinigung von PCR-Produkten	55
4.3.6	Fällung von DNA	55
4.3.7	Restriktion von DNA.....	56
4.3.8	Dephosphorylierung von Plasmiden.....	56
4.3.9	Ligation.....	56
4.3.10	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	56
4.3.11	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	56
4.3.12	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	57
4.3.13	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	57
4.3.14	Transformation von kompetenten <i>S. cerevisiae</i> Zellen	57
4.3.15	Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>	57
4.3.16	Transformation von <i>S. pombe</i> Zellen	57
4.3.17	Das Zwei-Hybrid-System	58
4.3.18	Tropftest.....	58
4.3.19	Herstellung von <i>S. pombe</i> Stämmen zur Produktion von Fusionsproteinen	59
4.3.20	Konstruktion von <i>S. pombe</i> Stämmen, die das 3HA-Tor1- bzw. 3HA-Tor2- Fusionsprotein produzieren	60
4.3.21	Überprüfung der Stämme	61
4.3.22	Konstruktion von <i>S. pombe</i> Deletionsmutanten	61
4.3.23	Tetradenanalyse	61
4.3.24	Paarungstypbestimmung.....	62
4.3.25	Herstellung von Rohextrakten von <i>S. pombe</i> -Zellen.....	62
4.3.26	Proteinbestimmung.....	63
4.3.27	Immunpräzipitation von Fusionsproteinen.....	63
4.3.28	Subzelluläre Fraktionierung	63
4.3.29	Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus von SpGad8.....	64
4.3.30	Dephosphorylierung von Proteinen	65
4.3.31	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	65
4.3.32	Western Blot-Analyse.....	66
4.3.33	„Strippen“ eines Western Blots	67
4.3.34	Verwendung eines SDS-Gels mit einem niedrigeren Acrylamid- Bisacrylamid-Vernetzungsgrad	67
4.3.35	„Phos-tag“-Gele	68
5	Ergebnisse.....	69
5.1	Konservierung der TOR-Komplexe in <i>S. pombe</i>	69
5.1.1	Existenz von homologen Proteinen der TOR-Komplex Mitglieder.....	69
5.1.2	Existenz und Zusammensetzung von TOR-Komplexen in <i>S. pombe</i>	70
5.1.2.1	Interaktion von SpTor2 und SpMip1	70
5.1.2.2	Interaktion von SpTor2 und SpWat1	71
5.1.2.3	Interaktion von SpMip1 und SpWat1	71
5.1.2.4	Keine Interaktion von SpTor2 und SpSte20.....	72
5.1.2.5	Keine Interaktion von SpTor2 und SpSin1	72
5.1.2.6	Keine Interaktion von SpMip1 und SpSte20	73
5.1.2.7	Keine Interaktion von SpMip1 und SpSin1	73
5.1.2.8	Existenz eines TOR-Komplex 1	74
5.1.2.9	Interaktion von SpTor1 und SpSin1	74
5.1.2.10	Interaktion von SpTor1 und SpSte20.....	75
5.1.2.11	Interaktion von SpTor1 und SpWat1	75
5.1.2.12	Interaktion von SpSin1 und SpSte20	76

5.1.2.13	Interaktion von SpSin1 und SpWat1.....	76
5.1.2.14	Interaktion von SpSte20 und SpWat1.....	77
5.1.2.15	Keine Interaktion von SpTor1 und Sp Mip1.....	77
5.1.2.16	Existenz eines TOR-Komplex 2.....	78
5.1.3	Phänotyp von TOR-Komplex-Mutanten.....	79
5.1.3.1	Phänotypen von TOR-Komplex 1 Deletionsmutanten.....	79
5.1.3.2	Phänotypen von TOR-Komplex 2 Deletionsmutanten.....	79
5.1.4	Komplementationsanalysen von TOR-Komplex-Mitgliedern aus..... <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	80
5.1.4.1	Keine Komplementation eines <i>GALI_{prom}-KOG1</i> -Stammes durch <i>mip1</i> ⁺ unter reprimierenden Bedingungen.....	81
5.1.4.2	Keine Komplementation eines <i>GALI_{prom}-AVO1</i> -Stammes durch <i>sin1</i> ⁺ unter reprimierenden Bedingungen.....	82
5.1.4.3	Keine Komplementation eines <i>GALI_{prom}-AVO3</i> -Stammes durch <i>ste20</i> ⁺ unter reprimierenden Bedingungen.....	82
5.1.4.4	Komplementation eines <i>GALI_{prom}-LST8</i> -Stammes durch <i>wat1</i> ⁺ unter reprimierenden Bedingungen.....	83
5.2	Einfluss von Rapamycin auf den TOR-Signalweg in <i>S. pombe</i>	85
5.2.1	Interaktion von SpFkh1 und SpTor1/2.....	85
5.2.1.1	Interaktion von SpFkh1 und SpTor1.....	85
5.2.1.2	Interaktion von SpFkh1 und SpTor2.....	86
5.2.2	Phänotypische Untersuchungen von TOR-Komplex 2-Deletionsmutanten..... in Anwesenheit von Rapamycin.....	87
5.2.3	Rapamycin-Sensitivität bei der Überexpression von <i>tor1</i> ⁺ und <i>tor2</i> ⁺	90
5.3	Einfluss von Rapamycin auf das TOR-Komplex 2-Zielprotein SpGad8.....	92
5.3.1	Phosphorylierungsstatus von SpGad8 in Abhängigkeit von Rapamycin.....	92
5.3.1.1	Nachweis der Phosphorylierung von SpGad8 durch Phospho-Serin-..... spezifische Antikörper.....	92
5.3.1.2	Nachweis der Phosphorylierung von SpGad8 durch „Low-crosslinker“-..... SDS-Gele.....	93
5.3.1.3	Nachweis der Phosphorylierung von SpGad8 durch „Phostag“-Gele.....	93
5.3.2	Phänotypische Untersuchungen von Δ <i>gad8</i> -Deletionsmutanten.....	94
5.4	Ist die Interaktion zwischen der leichten Kette des Clathrins und der TOR-..... Komplex 2-Komponente SpSte20/ ScAvo3/ mRictor konserviert?.....	96
5.4.1	Interaktion von ScAVO3 und ScCLC1.....	96
5.4.2	Bedeutung der HR1-Domäne für die Membranassoziation von SpSte20.....	98
6	Diskussion.....	101
6.1	Konservierung der TOR-Komplexe.....	101
6.1.1	Existenz von homologen Proteinen der TOR-Komplex-Mitglieder.....	101
6.1.2	Existenz von TOR-Komplexen.....	101
6.1.2.1	Existenz von TOR-Komplexen in <i>S. pombe</i>	101
6.1.3	Phänotyp von TOR-Komplex-Mutanten.....	105
6.1.4	Komplementationsanalysen von TOR-Komplex-Mutanten aus..... <i>S. cerevisiae</i> und <i>S. pombe</i>	108
6.2	Einfluss von Rapamycin auf den TOR-Signalweg in <i>S. pombe</i>	109
6.2.1	Interaktion von SpFkh1 und SpTor1 und SpTor2.....	110
6.2.2	Phänotypische Untersuchungen von TOR-Komplex 2-Deletionsmutanten..... in Anwesenheit von Rapamycin.....	111
6.2.3	Rapamycin-Sensitivität bei der Überexpression von <i>tor1</i> ⁺ und <i>tor2</i> ⁺	112
6.3	Einfluss von Rapamycin auf das TORC2-Zielprotein SpGad8.....	112
6.3.1	Phosphorylierungsstatus von SpGad8 in Abhängigkeit von Rapamycin.....	113

6.3.2	Phänotypische Untersuchungen von $\Delta gad8$ -Deletionsmutanten in Anwesenheit von Rapamycin	114
6.4	Ist die Interaktion zwischen der leichten Kette des Clathrins und der TOR-Komplex 2-Komponente SpSte20/ScAVO3/mRictor konserviert?	115
6.4.1	Interaktion von ScAVO3 und ScClc1	115
6.4.2	Bedeutung der HR1-Domäne für die Membranassoziation von SpSte20	116
7	Abkürzungsverzeichnis	119
8	Anhang.....	121
8.1	Funktionalität der Stämme.....	121
8.2	Sequenzvergleiche der TOR-Komplex-Mitglieder aus Hefen und Säugern	124
8.3	Sequenzvergleiche der SpClc1, ScCLC1 und mCLC1	135
9	Literaturverzeichnis	136
	Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung	166

1 Zusammenfassung

Zellen sind darauf angewiesen, ihre Lebensbedingungen wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Der TOR („Target of Rapamycin“)-Signalweg spielt dabei eine wichtige Rolle, indem er das Wachstum in Abhängigkeit von Nährstoffen und Hormonen reguliert. In dieser Arbeit wurde die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) als Modellorganismus für die Untersuchungen des TOR-Signalweges verwendet. Dabei zeigte sich, dass in *S. pombe*, wie in Säugern und der Bäckerhefe, zwei TOR-Komplexe existieren. Ko-Immunpräzipitationsexperimente zeigten, dass sich der TOR-Komplex 1 aus SpTor2, SpMip1 und SpWat1 zusammensetzt. Bei SpTor1, SpSin1, SpSte20 und SpWat1 handelt es sich um Mitglieder des TOR-Komplex 2. Phänotypische Analysen von Mutanten in Genen, die für TOR-Komplex 2-Komponenten kodieren, unterstreichen, dass diese Proteine in der Zelle ähnliche Funktionen bei der Antwort auf verschiedene Stresssituationen ausüben. Die heterologe Expression von *wat1*⁺ in einer *S. cerevisiae* *Δlst8*-Mutante komplementiert deren Wachstumsdefekt, was untermauert, dass diese beiden Proteine tatsächlich gleiche Funktionen in der Zelle ausüben. Eine Membranassoziation der TOR-Komplexe, wie sie in Säugern und *S. cerevisiae* bereits beschrieben wurde, konnte in dieser Arbeit für die TOR-Komplex 2-Komponente SpSte20 nachgewiesen werden. Möglicherweise spielt dabei die Interaktion zwischen der leichten Kette des Clathrins mit SpSte20 eine Rolle. Auch für die homologen Proteine aus *S. cerevisiae*, ScCLC1 und ScAVO3, konnte mittels des "Zwei-Hybrid"-Systems eine Bindung nachgewiesen werden. Dieses deutet eine Konservierung dieser Proteininteraktion innerhalb von Eukaryonten an. Obwohl das vegetative Wachstum von *S. pombe* durch Rapamycin nicht gehemmt wird, zeigen die hier aufgeführten Daten eine *in vivo*-Bindung von SpFkh1 an sowohl SpTor1 als auch SpTor2 in Anwesenheit von Rapamycin. Das Phosphorylierungslevel von SpGad8, dem bisher einzigen postulierten TOR-Komplex 2-Zielprotein, wird durch die Bindung des SpFkh1-Rapamycin-Komplexes an SpTor1 jedoch nicht beeinflusst. Dies und die Tatsache, dass *Δgad8*-Mutanten ein Rapamycin-sensitives Wachstum zeigen, lassen vermuten, dass noch weitere bisher unbekannte SpTOR-Komplex-Zielproteine durch Rapamycin beeinflusst werden. Zusammengenommen unterstreichen die Daten dieser Arbeit die Konservierung der Komplexe und des von ihnen vermittelten Signaltransduktionsweges. Sie zeigen aber auch, dass die Wirkung von Rapamycin nicht einfach durch eine generelle Hemmung der Aktivität der Komplexe beschrieben werden kann, was insbesondere für die klinische Anwendung von Rapamycin von Bedeutung ist.

2 Summary

Cells need to sense their living conditions and react to it. The TOR ("Target of Rapamycin")-signaling pathway plays an important role in controlling cell growth in response to nutrients and hormones. For this study the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) was used as a model organism to investigate the TOR signaling pathway. This work provides evidence that in *S. pombe*, like in mammals and *S. cerevisiae*, two TOR-complexes (TORC) exist. Co-immunoprecipitation experiments demonstrate that TOR-complex 1 consists of SpTor2, SpMip1 and SpWat1, whereas SpTor1, SpSin1, SpSte20 and SpWat1 are members of the TOR complex 2. Phenotypic analyses of mutants in genes encoding TOR complex 2 components indicates that these proteins exercise similar functions e.g. in the response to different stresses. Heterologous expression of *wat1*⁺ in an *S. cerevisiae* *Alst8* mutant suppresses its growth defects which underlines that indeed both proteins fulfill same functions in the cell. Furthermore, this work proved membrane association of the TOR-complex 2 component SpSte20, which was already shown in mammals and *S. cerevisiae* before. The interaction between the clathrin light chain and SpSte20 possibly accounts for this membrane association. The study also shows that binding of the homologous proteins from *S. cerevisiae*, ScCLC1 and ScAVO3, is conserved since they also bind each other using a Yeast two hybrid system. Although vegetative growth of *S. pombe* is not inhibited by rapamycin, these data demonstrate an *in vivo* binding of SpFkh1 to SpTor1 as well as to SpTor2 in the presence of rapamycin. Nevertheless, phosphorylation of SpGad8, the only so far identified TOR-complex 2 substrate, is not altered in the presence of rapamycin. This and the fact that *Agad8*-mutants exhibit rapamycin sensitive growth suggest that other yet-to-be-identified SpTORC target proteins are influenced by rapamycin. Taken together this work underlines the conservation of TOR complexes and the TOR-signal transduction pathway. However, this work also shows that the effect of rapamycin cannot be simply described as a general inhibition of the activity of the two TOR-complexes, which is of particular importance for the clinical use of rapamycin.

3 Einleitung

Zellen sind darauf angewiesen, ihre Lebensbedingungen wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Signaltransduktionswege spielen dabei eine wichtige Rolle. Von großer Bedeutung ist der TOR-vermittelte Signalweg, der das Zellwachstum in Abhängigkeit von der Nährstoffverfügbarkeit reguliert (Barbet *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998; Beck und Hall, 1999; Cardenas *et al.*, 1999; Hardwick *et al.*, 1999; Komeili *et al.*, 2000; Crespo *et al.*, 2002).

3.1 Die TOR-Proteine

Die TOR-Proteine wurden erstmals bei der Selektion von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)-Mutanten, die resistent gegenüber Rapamycin waren, identifiziert (TOR= „Target of Rapamycin“; Heitman *et al.*, 1991). TOR-Proteine nehmen eine zentrale Rolle als Regulator des Zellwachstums in Abhängigkeit von Nährstoffen ein. Die TOR-Proteine sind hochkonserviert. Es finden sich homologe TOR-Proteine in *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*, Säugerzellen und anderen Eukaryonten (Sabers *et al.*, 1995; Oldham *et al.*, 2000; Weisman und Choder, 2001; Long *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005). TOR-Proteine lassen sich in die Familie der Phosphatidylinositol-3-kinase-verwandten Kinasen (PIKKs) einordnen und agieren als Serin/Threonin-Kinasen (Keith und Schreiber, 1995). Sie weisen eine charakteristische Domänenstruktur auf (Abbildung 3. 1). N-terminal finden sich zwei „HEAT („Huntingtin, Elongation Factor 3. A subunit of protein phosphatase A, TOR1“-repeat“-Domänen, die Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln, wie es z. B. bei ScTOR1 und ScKOG1 der Fall ist (Perry und Kleckner, 2003; Adami *et al.*, 2007). Die FAT („FKBP12-rapamycin-associated protein/TOR, ataxia-telangiectasia, transactivation/ transformation-domain-associated protein)-Domäne ist in allen PIKKs vorhanden (Bosotti *et al.*, 2000). Sie wird immer in Kombination mit einer FATC (FAT C-terminal) -Domäne gefunden. Beide Domänen sind für die Kinaseaktivität von mTOR notwendig. Sie dienen vermutlich der redoxabhängigen Stabilisierung der Tertiärstruktur (Takahashi *et al.*, 2000; Dames *et al.*, 2005). An der FRB-Domäne wird der FKBP-Rapamycin-Komplex gebunden. Mutationen, die Rapamycin-Resistenz verleihen, finden sich stets in dieser Domäne, sowohl in *S. cerevisiae* (Helliwell *et al.*, 1994; Stan *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1996) als auch in Säugerzellen (Brown *et al.*, 1995). Außerdem wird vermutet, dass durch die Fähigkeit der FRB-Domäne Phosphatidsäure zu binden, die Membranassoziation von mTOR vermittelt wird (Fang *et al.*, 2001; Avila-Flores *et al.*, 2005; Foster, 2007; Veverka *et al.*, 2008). Die

katalytische Domäne, die sich am C-Terminus befindet, ist homolog zu der katalytischen Domäne der Phosphatidylinositol 3/4-kinasen, besitzt aber keine Lipidkinase-Aktivität (Cafferkey *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 1993). Hefen besitzen zwei TOR-Proteine (*S. cerevisiae*: ScTOR1, ScTOR2), während in höheren Eukaryonten nur ein TOR-Protein (Säuger: mTOR; *Drosophila*: DdTOR; *Arabidopsis*: AtTOR) existiert.

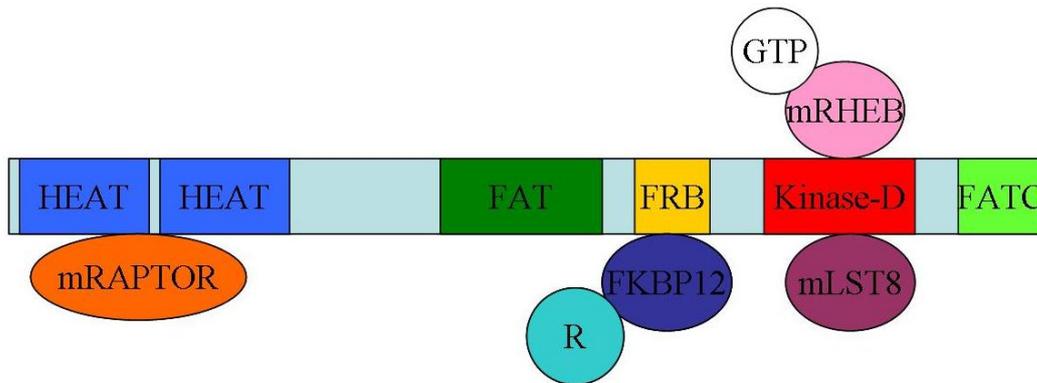


Abbildung 3. 1: Domänen-Struktur der TOR-Proteine modifiziert nach Schmelzle und Hall, 2000.

HEAT: "HEAT-repeats", FAT: FAT-Domäne; FRB: FRB-Domäne; Kinase-D: Kinase-Domäne; FATC: FATC-Domäne; R: Rapamycin

3.2 Der TOR-Signaltransduktionsweg in Säugern und der Bäckerhefe *S. cerevisiae*

Die ersten Studien des TOR-Signaltransduktionsweges sind in *S. cerevisiae* durchgeführt worden. Nicht zuletzt aufgrund der medizinischen Relevanz folgten zahlreiche Untersuchungen in Säugern. Im Folgenden sollen vor allem die bisherigen Erkenntnisse aus Säugern zusammengefasst werden.

3.2.1 Die TOR-Komplexe

In Säugern existieren zwei mTOR-Komplexe (Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Loewith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004).

3.2.1.1 Der TOR-Komplex 1

Der mTOR-Komplex 1 setzt sich aus mTOR, mRAPTOR und mLST8/mGβ1 zusammen (Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Loewith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). Wird der mTOR-Komplex 1 aktiviert (Wullschleger *et al.*, 2005), phosphoryliert er seine Zielproteine, wie z. B. die ribosomale mS6-Kinase oder den Translationsinhibitor m4EBP1, an Serin- und Threoninresten. Eine Phosphorylierung der mS6-Kinase aktiviert diese, und phosphoryliert wiederum das 40S ribosomale Protein mS6, was zur Translation von mRNA führt, die für

ribosomale Proteine und Komponenten des Translationsapparates kodieren (Meyuhas *et al.*, 1996; Jefferies *et al.*, 1997; Burnett *et al.*, 1998). Der phosphorylierte Translationsinhibitor m4EBP1 dissoziiert von dem Initiationsfaktor meIF4E, so dass ein aktiver Translationskomplex mit meIF-4G gebildet und Cap-abhängige Translation stattfinden kann (Lin *et al.*, 1994; Pause *et al.*, 1994). Auch auf dem Level der Elongation beeinflusst mTOR die Proteinsynthese. Das Cyclin mCDC2 wird durch den mTOR-Komplex 1 aktiviert, wodurch meEF2K, die Kinase von meEF2, inhibiert wird (Smith und Proud, 2008). Der eukaryotische Elongationsfaktor meEF2 wird durch die Phosphorylierung durch die meEF2K inaktiviert (Redpath *et al.*, 1996). Somit reguliert der TOR-Komplex 1 über die mS6-Kinase, m4EBP1 und meEF2K die Translation positiv. Außerdem haben Microarrayanalysen ergeben, dass der mTOR-Komplex 1 die Expression zahlreicher Gene, die in metabolischen und biosynthetischen Wegen involviert sind, beeinflusst (Peng *et al.*, 2002). Der TOR-Komplex 1 spielt ebenfalls eine Rolle im Zellzyklus. Der Übergang zwischen den einzelnen Phasen des Zyklus (G1, S, G2 und M) wird durch verschiedene Mechanismen koordiniert. Durch den mTOR-Komplex 1 wird der Übergang zwischen der G1- und S-Phase über verschiedene Cycline und die Kip („Cyclin-abhängige Kinasen-Inhibitor-Proteine“-)-Familien-Mitglieder p21 und p27 kontrolliert (Takuwa *et al.*, 1997; Decker *et al.*, 2003; Hleb *et al.*, 2004; Leung-Pineda *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang wurde auch die Phosphorylierung von mSGK1 („serum and glucocorticoid-inducible kinase“) durch den mTOR-Komplex 1 postuliert. Die mSGK1 steuert wiederum die Funktion von mP27 (Hong *et al.*, 2008). Eine andere Studie widerspricht jedoch dieser Aussage, und sieht den mTOR-Komplex 2, und nicht den mTOR-Komplex 1 als notwendig für die Phosphorylierung und Aktivierung der mSGK1 an (Garcia-Martinez und Alessi, 2008). In Säugern liegt der mTOR-Komplex 1 als Dimer vor (Wang *et al.*, 2006). Auch in anderen Organismen, wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und *Drosophila melanogaster* wurden der ScTOR-Komplex 2 als Dimer bzw. DmTOR als Multimer nachgewiesen (Wullschleger *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

3.2.1.1.1 Die TOR-Komplex 1-Mitglieder

Das namensgebende Protein mTOR ist in beiden mTOR-Komplexen zu finden. In Säugern wurde die Rolle von mTOR in der Regulation des Zellwachstums in Abhängigkeit von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren mehrfach herausgestellt (Zhang *et al.*, 2000; Fingar *et al.*, 2002; Fingar und Blenis, 2004). Es sind drei Phosphorylierungsstellen von mTOR identifiziert worden, die für dessen Aktivität von Bedeutung sind. So wird Ser2481 autophosphoryliert, während die Aminosäurereste Thr2446 und Ser2448 durch die mS6-

Kinase phosphoryliert werden (Brown *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 2000; Chiang und Abraham, 2005; Holz und Blenis, 2005). Thr2446 wird möglicherweise auch durch die mAMPK phosphoryliert (Cheng *et al.*, 2004). Ohne funktionelles mTOR ist die Entwicklung von Maus-Embryonen, ähnlich wie bei Aminosäuremangel, gestört (Martin und Sutherland, 2001; Gangloff *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2004). Ist mTOR aktiv, phosphoryliert es seine Zielproteine an Serin- oder Threoninresten. Entsprechend der Beteiligung von mTOR an vielen zellulären Prozessen, haben die Zielproteine, die im Folgenden vorgestellt werden, vielfältige Funktionen.

Wie bereits erwähnt, sind in *S. cerevisiae* zwei TOR-Proteine vorhanden. ScTOR1 kann durch ScTOR2 funktionell ersetzt werden. ScTOR2 ist hingegen essentiell (Wullschleger *et al.*, 2005). Auch in *S. cerevisiae* sind zwei TOR-Komplexe präsent. ScTOR1 ist nur im ScTOR-Komplex 1 vorhanden, während ScTOR2 sowohl Mitglied von TOR-Komplex 1, als auch Mitglied von TOR-Komplex 2 sein kann (Loewith *et al.*, 2002; Wedamann *et al.*, 2003). Über diese Proteinkomplexe übt ScTOR verschiedene Funktionen aus. Der Rapamycin-sensitive TOR-Komplex 1 reguliert die „zeitliche Kontrolle des Zellwachstums“ über die Translation, Transkription und die Stabilität von Aminosäurepermeasen (Schmidt *et al.*, 1998; Beck und Hall, 1999; Komeili *et al.*, 2000; Jacinto *et al.*, 2001). Der TOR-Komplex 2 ist nicht Rapamycin-sensitiv und vollzieht die „räumliche Kontrolle des Zellwachstums“. Dieses wird über eine ScRHO1 gesteuerte Signalkaskade vermittelt, die letztendlich das Aktin-Zytoskelett organisiert (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Bickle *et al.*, 1998; Helliwell *et al.*, 1998; Schmelzle *et al.*, 2002).

In *Arabidopsis thaliana* wurde nachgewiesen, dass die AtTOR-Kinase das Zellwachstum und die Stressantwort den Umweltbedingungen anpasst (DeProst *et al.*, 2007).

Auch in *Drosophila melanogaster* ist ein DmTOR-Protein zu finden. Bei einer Disruption von DmTOR kommt es zu schweren Entwicklungsstörungen bei Embryonen, wie es auch unter Nährstoffmangel zu beobachten ist (Oldham *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Ebenso wurde dem DmTOR-Protein eine Rolle in der Differenzierung von Nervenzellen zugeschrieben (Bateman und McNeill, 2004).

Das TOR-Komplex 1 Mitglied mRAPTOR („regulatory associated protein of mTOR“) ist ein essentielles Protein. Ebenso wie heterozygote mTOR^{+/-}-Mäuse waren mRAPTOR^{+/-}-Mäuse nicht lebensfähig (Murakami *et al.*, 2004; Guertin *et al.*, 2006). mRAPTOR bindet an die HEAT-repeats von mTOR (Kim *et al.*, 2002). Diese Bindung ist Rapamycin-sensitiv und möglicherweise abhängig von Nährstoffen (Kim *et al.*, 2002; Oshiro *et al.*, 2004). mRAPTOR

ist notwendig für die Aktivität des TOR-Komplex 1. Es dient als eine Art Gerüstprotein zwischen mTOR und dessen Substraten, beeinflusst aber nicht dessen katalytische Aktivität. Sowohl die mS6-Kinase als auch m4EBP1 interagieren mit mRAPTOR (Hara *et al.*, 2002). Diese Interaktion wird durch die TOS-(„TOR-signaling“-Motive, die in allen bekannten S6-Kinasen N-terminal und in allen 4EBPs C-terminal zu finden sind, von m4EBP1 und der mS6-Kinase vermittelt. Ohne funktionelle TOS-Motive können diese Translationsregulatoren nicht an mRAPTOR binden und dadurch nicht durch mTOR phosphoryliert werden (Schalm und Blenis, 2002; Beugnet *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2003; Nojima *et al.*, 2003; Schalm *et al.*, 2003). Auch die RNC-Domäne („Raptor N-terminal conserved“) von Raptor ist erforderlich, um eine Bindung von m4EBP1 und mS6-Kinase und deren Phosphorylierung zu gewährleisten (Dunlop *et al.*, 2009).

An der Bindung von mTOR an die mSGK1 ist mRAPTOR beteiligt. Mit der Bindung geht die Phosphorylierung der mSGK1 einher. Diese Kinase phosphoryliert dann ihrerseits p27, einen Cdk-Inhibitor, wodurch der nukleäre Transport dieses Proteins verhindert wird. Somit kann p27 seine Funktion, das Cyklin mE-CDK2 in der G0 und G1-Phase des Zellzyklus zu binden und zu inhibieren, nicht mehr ausführen (Chu *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2008). In anderen Studien wurde ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des mTOR-Komplex 1 aufgrund des Fehlens des mTSC-Komplex und der cytoplasmatischen Akkumulation bzw. Reduktion von p27-mE-CDK2-Komplexen festgestellt (Soucek *et al.*, 2001). Auf dieselbe Weise wird p27 durch die Phosphorylierung von mAKT inhibiert (Liang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002; Viglietto *et al.*, 2002; Motti *et al.*, 2004).

Ein weiteres Zielprotein für mTOR ist mIRS-1: Dieses Protein ist ein Substrat des Insulin- oder Insulin-ähnlichen Rezeptors (Sun *et al.*, 1991; White *et al.*, 2002). Insulin stimuliert die Bindung der SAIN („Shc and IRS-1 NPKX binding“-Domäne von mIRS-1 an mRAPTOR, worauf die Phosphorylierung der Ser636/639 von mIRS-1 durch mTOR folgt. Für diese Phosphorylierung ist auch mLST8 erforderlich (Tzatsos und Kandror, 2006; Tzatsos *et al.*, 2009). Die phosphorylierten Aminosäuren liegen nahe dem Motif, welches für die Bindung von mIRS-1 an die mPI3K zuständig ist. Durch diese Phosphorylierung wird der über mIRS-1-vermittelte mPI3K/mAKT-Signalweg unterdrückt (Tzatsos und Kandror, 2006). Der mTOR-Komplex 1 kontrolliert mIRS-1 auch durch weitere inhibitorische Phosphorylierungen an Ser307 und Ser312, die eine Interaktion mit dem Insulin-Rezeptor stören (Harrington *et al.*, 2004; Shah und Hunter, 2006; Tzatsos und Kandror, 2006). Auf diese Weise reguliert der mTOR-Komplex 1 den mPI3K/mAKT-Weg negativ über die mRAPTOR-abhängige Phosphorylierung von mIRS-1 durch mTOR.

In Abwesenheit von Insulin bindet mPRAS 40 („proline-rich Akt substrate of 40 kDa“) ebenfalls über TOS-Motive an mRAPTOR. Dadurch wird eine Bindung der mTOR-Substrate an mRAPTOR verhindert und somit der mTOR-Komplex 1 negativ reguliert. In Anwesenheit von Insulin wird mPRAS40 durch mAKT phosphoryliert. In diesem Fall findet keine Assoziation an mRAPTOR und somit keine Hemmung des mTOR-Komplex 1 statt (Wang *et al.*, 2006; Fonseca *et al.*, 2007; Oshiro *et al.*, 2007; Sancak *et al.*, 2007; Thedieck *et al.*, 2007; Van der Haar *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Für die Funktion von mRAPTOR spielt der Phosphorylierungsstatus eine wichtige regulatorische Rolle. Zum Einen wird es durch mTOR an Ser863 und Ser859 phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen werden durch Insulin stimuliert und durch Rapamycin inhibiert. Eine Mutation des Ser863 reduziert die mTOR-Komplex 1-Aktivität. Die Phosphorylierungen von mRAPTOR durch mTOR regulieren den mTOR-Komplex 1 demnach positiv (Wang *et al.*, 2009). Zum Anderen wird mRAPTOR unter bestimmten Stressbedingungen durch die mS6-Kinase an Ser719, Ser721 und Ser722 phosphoryliert, wodurch der mTOR-Komplex 1, unabhängig des mAKT/PI3K-Weges, aktiviert wird (Carriere *et al.*, 2008). Wird mRAPTOR jedoch von mAMPK an Ser722 und Ser792 phosphoryliert, kommt es zur Inhibierung der mTOR-Komplex 1-Funktionen. Dieses stellt einen alternativen Regulationsmechanismus als Reaktion auf den Energiestatus der Zelle, unabhängig von dem mTSC-Komplex dar, der als GTPase-aktivierender Proteinkomplex mTOR über die kleine GTPase mRHEB negativ reguliert (Li *et al.*, 2004; Gwinn *et al.*, 2008).

Eine Regulation von mTOR über mRAPTOR erfolgt ebenfalls über dessen Interaktion mit mRAG-Proteinen. In Säugern gibt es vier mRAG-Proteine, die als GTPasen fungieren: mRAG A, mRAG B, mRAG C und mRAG D. Diese bilden Heterodimere (Nakashima *et al.*, 1999; Sekiguchi *et al.*, 2001). Wie alle G-Proteine sind sie abhängig von ihrem GDP/GTP-Status, allerdings in ungewöhnlicher Weise, da das mRAG B^{GTP}-mRAG C^{GDP}-Heterodimer am besten an den mTOR-Komplex 1 bindet. Bei ausreichendem Vorhandensein von Aminosäuren erfolgt die Bindung eines mRAG-Heterodimers an mRAPTOR, was dazu führt, dass sich die Lokalisation des TOR-Komplex 1 verändert. Dieser Proteinkomplex befindet sich daraufhin in demselben Kompartiment wie sein aktivierendes Protein mRHEB. Somit wird über die mRAG-GTPasen die mTOR-Komplex 1-Aktivität in Abhängigkeit von der Aminosäureverfügbarkeit positiv gesteuert (Sancak *et al.*, 2008).

Das mRAPTOR-Homologe in *S. cerevisiae* ScKOG1 („kontroller of growth“) ist ebenfalls essentiell. Dort ist es auch an der Bildung eines ScTOR-Komplex 1 beteiligt (Loewith *et al.*, 2002; Wedaman *et al.*, 2003). Es bindet an die „HEAT (Huntingtin, Elongation Factor 3. A

subunit of protein phosphatase A, TOR1)-repeat"- von ScTor1 über seine „WD40 (Trp-Asp: W-D)-repeat“-Domänen (Adami *et al.*, 2007).

Das mRAPTOR-Homologe in *S. pombe* - SpMip1 - ist essentiell und im Cytoplasma lokalisiert. Eine *mip1*⁺-Mutante mit einer N-terminal verkürzten Form von SpMip1 wurde bei der Selektion von *S. pombe* Kolonien, die den meiotischen Defekt von *mei2*-Mutanten unterdrücken, isoliert. „WD40“- und „HEAT-repeats“ deuten darauf hin, dass SpMip1 mit anderen Proteinen interagiert. SpMip1 bindet an unphosphoryliertes SpMei2, daher auch der Name SpMip1(= SpMei2 interacting protein) (Shinozaki-Yabana *et al.*, 2000). SpMei2 ist ein RNA-Bindeprotein, welches für die Induktion der prämeiotischen DNA-Synthese und ersten meiotischen Teilung notwendig ist (Bresch *et al.*, 1968; Watanabe *et al.*, 1988). Die Pat1p-Kinase phosphoryliert SpMei2, was zur Inaktivität von SpMei2 führt (McLeod *et al.*, 1986; Watanabe *et al.*, 1997). Der Transkriptionsfaktor SpSte11 reguliert ebenfalls SpMei2, indem er bei Nährstoffmangel, neben anderen Genen für Paarung und Meiose, die Expression von *mei2*⁺ induziert (Sugimoto *et al.*, 1991). SpMip1 interagiert auch mit SpSte11, wodurch dieses aktiviert wird. So nimmt SpMip1, vermittelt durch SpMei2 und SpSte11, Einfluss auf Paarung und Meiose in *S. pombe*. Temperatursensitive *mip1*⁺-Mutanten zeigten Wachstumsdefekte und teilen sich bei einer geringeren Zellgröße als Wildtypzellen. Zusätzlich spricht die Akkumulation von Zellen mit einem 1C-DNA-Gehalt für eine Bedeutung von SpMip1 für das Zellwachstum, die Mitose und den Zellzyklus (Watanabe *et al.*, 1988; Sugimoto *et al.*, 1991; Shinozaki-Yabana *et al.*, 2000).

In *Arabidopsis thaliana* kodieren zwei Gene für homologe mRAPTOR-Proteine. Während AtRaptor 1 notwendig für die Embryo-Entwicklung ist, wirken sich Mutationen in dem Gen, kodierend für AtRaptor2, kaum phänotypisch aus (Deprost *et al.*, 2005). Die Interaktion von AtTOR und AtRaptor beeinflusst die Aktivität der AtS6-Kinase unter osmotischen Stressbedingungen (Mahfouz *et al.*, 2006).

Auch in *Drosophila melanogaster* wurde eine Assoziation von DmTOR und DmRAPTOR gezeigt. Sowohl an der Phosphorylierung der DmS6-Kinase als auch an der Steuerung der G2/M-Phase des Zellzyklus ist DmRAPTOR beteiligt (Lee und Chung, 2007; Mary *et al.*, 2007).

Das Protein mLst8 („lethal with sec-thirteen“) ist in beiden mTOR-Komplexen zu finden (Loewith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). Es interagiert mit mTOR über dessen Kinase-Domäne (Kim *et al.*, 2003). Mutanten, in denen die Produktion von mLST8 reduziert ist, zeigen, dass mLST8 nicht essentiell ist. Ohne funktionelles mLST8 kann jedoch keine

Interaktion zwischen mTOR und mRAPTOR stattfinden. Außerdem reguliert es die Aktivität des mTOR-Komplex 1 positiv, indem es die Phosphorylierung der mS6-Kinase und m4EBP1 stimuliert. Für Funktionen des mTOR-Komplex 2, wie die Phosphorylierung von mAKT und mPKC α ist mLST8 ebenfalls notwendig (Kim *et al.*, 2003; Guertin *et al.*, 2006).

In *S. cerevisiae* ist das homologe Protein zu mLST8- ScLST8 - essentiell. Auch hier ist ScLST8 Mitglied beider ScTOR-Komplexe und bindet an die Kinase-Domäne von ScTOR2 (Loewith *et al.*, 2002; Wullschleger *et al.*, 2005). Mutationen in *LST8* führen zu Defekten des Transportes von Aminosäurepermeasen, wie z. B. ScGAP1, vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Roberg *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001). Im Falle von ScGAP1 beeinflusst ScLST8 dessen Lokalisation über die beiden Transkriptionsfaktoren ScRTG1 und ScRTG3, die die Transkription der Gene für die α -Ketoglutarat-Synthese steuern (Liu *et al.*, 2001; Chen und Kaiser, 2003). Dadurch kontrolliert ScLST8 letztendlich die Synthese aller Aminosäuren (Magasanik *et al.*, 1992; Liu und Butow, 1999; Komeili *et al.*, 2000). ScRTG1 und ScRTG3 werden negativ von ScLST8 reguliert. So wird durch eine Mutation von *LST8* die Aktivität von ScRTG1 und ScRTG3 erhöht, was zu einer Akkumulation von Aminosäuren in der Zelle führt. Daraufhin ist ScGAP1 an der Vakuole und nicht an der Zellmembran lokalisiert (Chen und Kaiser, 2003).

SpWat1 ist das homologe Protein von mLST8. Im Gegensatz zu ScLst8 sind $\Delta wat1$ -Mutanten lebensfähig (Kemp *et al.*, 1997; Ochotorena *et al.*, 2001). Das Protein wurde aufgrund der charakteristischen Morphologie von $\Delta wat1$ -Mutanten SpWat1 (= watermelonshaped) genannt. Diese auffällige Morphologie ist die Konsequenz eines delokalisierten Aktin-Zytoskeletts (Kemp *et al.*, 1997). Weitere Studien lassen vermuten, dass SpWat1 für die Genomstabilität von Bedeutung ist (Ochotorena *et al.*, 2001). Funktionelles SpWat1 ist notwendig für die Aufrechterhaltung des α -Tubulin-Levels und somit für die Funktionalität der Mikrotubuli, die bei der Chromosomenseparation eine bedeutende Rolle spielen. Außerdem wird die Reifung der mRNA durch SpWat1 beeinflusst. Der genaue Vorgang ist allerdings noch nicht geklärt (Ochotorena *et al.*, 2001). Die Existenz von „WD40-repeats“ deutet Interaktionen mit anderen Proteinen an. Unter Anderem ist eine Interaktion mit SpPrp2 bereits bekannt, einem Protein, das ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Genomstabilität spielt (Takahashi *et al.*, 1994; Kemp *et al.* 1997; Ochotorena *et al.*, 2001).

Zwei mLST8-Homologe sind in *Arabidopsis thaliana* vorhanden, jedoch ist deren Funktion unbekannt (Wullschleger *et al.*, 2005).

Das Homologe zu mLST8 in *Dictyostelium discoideum* –DdLST8– spielt eine Rolle bei der Zellpolarität und der gerichteten Chemotaxis und somit bei der Aggregation der Zellen (Lee *et al.*, 2005).

In *Drosophila melanogaster* ist auch ein mLST8-Homolog identifiziert worden, von dem bisher lediglich bekannt ist, dass es mit einem Protein unbekannter Funktion interagiert (Giot *et al.*, 2003).

3.2.1.2 Der TOR-Komplex 2

Der mTOR-Komplex 2 setzt sich aus mTOR, mRICTOR, mSIN1 und mLST8 zusammen (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004). Dieser Komplex ist für die Aktinpolymerisation und die Phosphorylierung von mAKT von Bedeutung (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2005). Darauf wird jeweils in Kapitel 3.2.1.2.1 näher eingegangen. Wie bereits in Kapitel 3.2.1.1 erwähnt, ist der mTOR-Komplex 2 auch für die Phosphorylierung und Aktivierung der mSGK1 zuständig, die ihrerseits über p27 Einfluss auf den Zellzyklus nimmt (Garcia-Martinez und Alessi, 2008).

3.2.1.2.1 Die mTOR-Komplex 2-Mitglieder

Ein Mitglied des mTOR-Komplex 2 ist mRICTOR („rapamycin insensitive companion of mTOR“) (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004). In Zellen, in denen kein mRICTOR produziert wird, ist eine verminderte Phosphorylierung von der mPKC α und eine Delokalisation der Aktinfasern zu erkennen (Sarbassov *et al.*, 2004). Die beiden Rho-GTPasen mRHO und mRAC regulieren die Polymerisierung und Depolymerisierung von mF-Aktin (Etienne-Manneville und Hall, 2002). In Zellen ohne funktionelles mTOR, mRICTOR oder mLST8 können aktive Formen von mRHO bzw. mRAC den Aktin-Defekt supprimieren (Jacinto *et al.*, 2004). Zusammen mit mTOR und mLST8 organisiert mRICTOR das Aktin-Zytoskelett somit über eine Rho-GTPase und über die mPKC α (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004). Es wurde außerdem eine positive Regulation von mAKT durch mTOR und mRICTOR nachgewiesen. Dabei wird mAKT an Ser473 phosphoryliert, worauf die Erkennung und Phosphorylierung von Thr308 durch die PDK1 folgt (Alessi *et al.*, 1996; Alessi *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998; Scheid *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Sarbassov *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006). Eine Reduktion des mTOR- oder mRICTOR-Levels führt dementsprechend zu einer verminderten Phosphorylierung des mAKT-Effektorproteins, dem Transkriptionsfaktor mAFX (Sarbassov *et al.*, 2004). Ein weiterer Interaktionspartner von mRICTOR ist mPRR5L („Proline-rich protein 5-like“). Untersuchungen mit reduzierter PRR5L-Expression zeigen keine Auswirkungen auf die Integrität des mTOR-Komplex 2 und

Phosphorylierungen der Zielproteine, deuten aber auf eine positive regulatorische Rolle in der Apoptose hin (Thedieck *et al.*, 2007; Woo *et al.*, 2007).

Das essentielle Protein ScAVO3 stellt das homologe Protein zu mRICTOR in *S. cerevisiae* dar und ist ebenfalls Mitglied des ScTOR-Komplex 2 (Loewith *et al.*, 2002; Wedamann *et al.*, 2003; Wullschleger *et al.*, 2005). Der Phänotyp von *avo3^{ts}*-Mutanten deutet auf eine Involvierung von ScAVO3 bei der Zellwandintegrität, der Integrität des ScTOR-Komplex 2 und der Organisation des Aktinzytoskeletts hin. Diese Defekte können durch die ScTOR-Komplex 2 Mitglieder ScAVO1 und ScAVO3, nicht aber durch TOR-Komplex 1 Mitglieder aufgehoben werden. Auch das Phosphoinositidbindeprotein ScSLM1 supprimiert den Phänotyp der *avo3^{ts}*-Mutanten (Ho *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2008). ScSLM1 bildet mit ScSLM2 einen Komplex, um das Aktinzytosklett unter Stressbedingungen zu regulieren. Für die Sphingolipid-abhängige Phosphorylierung von ScSLM1 und ScSLM2 durch den ScTOR-Komplex 2 ist ein funktionelles ScAVO3 notwendig (Audhya *et al.*, 2004; Fadri *et al.*, 2005; Tabuchi *et al.*, 2006; Ho *et al.*, 2008). Möglicherweise besteht eine Verbindung des ScTOR-Komplex 2 über ScAVO3 mit dem Sphingolipidstoffwechsel, was frühere Studien bereits vermuten ließen. Das Gen *CSG2* kodiert für ein Protein, das notwendig für die Calciumregulation ist (Beeler *et al.*, 1994). Die Deletion von *CSG2* führt zur Akkumulation eines Sphingolipids (Inositolphosphorylceramid), wodurch eine Calciumsensitivität der Zellen hervorgerufen wird. Dieser Phänotyp wird von *avo3^{ts}*-Mutanten von Δ *csg2*-Mutanten unterdrückt. ScAVO3 scheint daher möglicherweise auch eine Rolle bei der Sphingolipidsynthese einzunehmen (Beeler *et al.* 1998).

Das mRICTOR-Homologe in *S. pombe* - SpSte20 - wurde bei der Selektion von Amylorid-resistenten *S. pombe* Zellen, die Defekte bezüglich der Paarung und Sporulation zeigen, identifiziert. Zellen, in denen *ste20⁺* deletiert ist, sind lebensfähig. Bei Stickstoffmangel kontrolliert SpSte20 sowohl den G1-Arrest als auch die sexuelle Entwicklung positiv über die Expression von *ste11⁺* und *mei2⁺* (Hilti *et al.*, 1999).

In *Dictyostelium discoideum* ist das mRICTOR-Homologe – DdPianissimo (DdPia) – Bestandteil eines DdTOR-Komplexes. Neben DdPia regulieren auch DdRip3 und DdLst8 in diesem Komplex die Aggregation der *Dictyostelium*-Zellen. Wenn die entsprechenden Gene dieser Proteine deletiert sind, sind sowohl die durch cAMP stimulierte Aktivierung der Adenylatzyklase als auch die Chemotaxis und die Zellpolarität gestört (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2005).

In *Drosophila melanogaster* zeigen Mutanten ohne funktionelles DmRICTOR eine verminderte Phosphorylierung von dAKT, was eine erhöhte Apoptose-Rate zur Folge hat (Lee und Chung, 2007).

Ebenfalls im mTOR-Komplex 2 vorhanden, ist mSIN1 (Frias *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Es handelt sich um ein essentielles Protein, wie Studien mit Mutanten, bei denen die Expression für das mSIN1-kodierende Gens abgeschaltet ist, zeigen (Jacinto *et al.*, 2006). Neben fünf hochkonservierten Domänen (SCD I-V; „strongly conserved domains“) besitzt mSIN1 auch eine RB-Domäne („Raf-like Ras-binding“), die aktiviertes mH- und mK-RAS bindet, und eine PH-Domäne („Pleckstrin homology“), die an Lipide und Membranen bindet (Schroder *et al.*, 2005; Wang und Roberts, 2005). Studien mit niedrigem und hohem Produktionslevel weisen mSIN1 als Inhibitor von mRAS nach (Schroder *et al.*, 2005; Schroder *et al.*, 2007). Es gibt fünf verschiedene Spleißvarianten von mSIN1: mSIN α , mSIN1 β , mSIN1 γ , mSIN1 δ und mSIN1 ϵ (Schroder *et al.*, 2004). Davon sind drei Varianten im mTOR-Komplex 2 zu finden (Wang und Roberts, 2005). Ebenso wie mRICTOR ist mSIN1 für die Phosphorylierung des Ser473 von mAKT durch den mTOR-Komplex 2, nicht jedoch für die Phosphoylierung des Thr308 von mAKT durch mPDK1, wichtig. Außerdem ist ohne funktionelles mSIN1 die Interaktion von mTOR und mRICTOR, und somit die Integrität des mTOR-Komplex 2 gestört (Alessi *et al.*, 1997; Stephens *et al.*, 1998; Sarbassov *et al.*, 2005; Frias *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006). Durch die Bindung von mSIN1 an mJNK („Jun NH₂-terminal protein kinase“), p38 und mATF2 nimmt es an dem SAPK („stress-activated protein kinase“)-Signalweg teil (Schroder *et al.*, 2004; Makino *et al.*, 2006). Sowohl mJNK als auch p38 sind SAP-Kinasen, die unter Stressbedingungen den Transkriptionsfaktor mATF2 phosphorylieren und aktivieren. Dadurch wird letztendlich die Expression von Genen zur Apoptose angeschaltet (Gupta *et al.*, 1995; Livingstone *et al.*, 1995; van Dam *et al.*, 1995; Persengiev und Green, 2003). Die Bindung von mSIN1 an mIFNAR2 („interferon receptor subunit 2) deutet eine Beteiligung am Interferon-Signalweg an (Wang und Roberts, 2004).

In *S. cerevisiae* gehört das mSIN1-Homologe- ScAVO1 zu dem ScTOR-Komplex 2 (Loewith *et al.*, 2002; Wedamann *et al.*, 2003; Wullschleger *et al.*, 2005). ScAVO1 ist ein essentielles Protein, das, wie mSIN1, eine RB-Domäne („Raf-like Ras-binding“) besitzt. Mutationen in *AVO1* führen zu Defekten des Aktin-Cytoskeletts (Loewith *et al.*, 2002). Kürzlich wurde festgestellt, dass ScAVO1 die Membranlokalisation des TOR-Komplex 2 vermittelt (siehe Kapitel 3.2.3; Berchthold und Walther, 2009).

Ein homologes Protein zu mSIN1 wurde in *S. pombe* ebenfalls identifiziert. Das nicht-essentielle Protein SpSin1 (Sty1-interacting protein) wurde mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems auf der Suche nach Interaktionspartnern von SpSty1 erstmals beschrieben (Wilkinson *et al.*, 1999). SpSty1 ist eine Komponente des SAPK-Signaltransduktionsweg („stress-activated MAPK pathway“), welcher als Reaktion auf Stress den Zellzyklus, die Meiose und spezielle Stressreaktionen reguliert. SpSty1 stellt die MAP-Kinase dar. Die MAP-Kinase-Kinase wird von SpWis1 und die MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen werden von SpWak1 und SpWin1 repräsentiert (Warbrick and Fantès, 1991, Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russel, 1995; Kato *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1997; Samejima *et al.*, 1998). SpSty1p ist strukturell verwandt mit den SAPKs aus Säugern und reagiert auf ähnliche Reize wie oxidativen Stress, osmotischen Stress, UV-Strahlung und Hitze-Stress (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki und Russel, 1995; Degols *et al.*, 1996; Degols und Russel, 1997; Shieh *et al.*, 1997). Unter normalen Bedingungen ist SpSty1 im Cytoplasma lokalisiert. Wird es durch Stress phosphoryliert und dadurch aktiviert, gelangt es, unterstützt durch SpSin1, in den Zellkern. Dort bindet und phosphoryliert es den Transkriptionsfaktor SpAtf1 (Shiozaki *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996, Wilkinson *et al.*, 1999). Außerdem wird durch SpSty1 die Translokation des Transkriptionsfaktors SpPap1 in den Zellkern positiv gesteuert (Toone *et al.*, 1998). SpSin1 wird ebenfalls, unabhängig von SpSty1, bei osmotischem Stress phosphoryliert (Wilkinson *et al.*, 1999). Neben SpSty1 ist auch SpSin1 notwendig für die Funktion der Transkriptionsfaktoren SpAtf1 und SpPap1, die die Expression verschiedener Stressantwortgene regulieren (Toda *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 1995). SpSin1 ist also ein bedeutender Bestandteil einer Signalkaskade, die zur Stress-aktivierten Expression bestimmter Gene in *S. pombe* führt. Eine Deletion von *sin1*⁺ führt dementsprechend zu einer höheren Sensitivität gegenüber verschiedenen Stressbedingungen, wie z. B. Hitze oder osmotischem Stress, aber auch zu Defekten in der sexuellen Entwicklung (Wilkinson *et al.*, 1999).

In *Dictyostelium discoideum* stellt DdRip3 das homologe Protein zu mSIN1 dar und ist dort auch Bestandteil eines DdTOR-Komplexes. Zusammen mit DdPia und DdLst8 reguliert DdRip3 die cAMP-gesteuerte Chemotaxis und damit auch die Aggregation der *Dictyostelium*-Zellen (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005).

3.2.2 Regulation von mTOR

In Säugerzellen wird der mTOR-Komplex 1-Weg sowohl durch Wachstumsfaktoren als auch Nährstoffe, das Energielevel und Stress beeinflusst. Der mTOR-Komplex 2 wird durch

Nährstoffe, Wachstumsfaktoren oder Hormone gesteuert (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2005; Jacinto *et al.*, 2006). In den folgenden Kapiteln wird auf die Regulation des mTOR-Komplex 1 eingegangen, über die deutlich mehr bekannt ist, als über die Regulation des mTOR-Komplex 2.

3.2.2.1 Aktivierung des TOR-Komplex 1 durch Wachstumsfaktoren

Der mTOR-Signalweg wird durch Wachstumsfaktoren über den mPI3K-mAKT-Weg reguliert. Die Bindung von Insulin oder Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren verursacht die Rekrutierung und Phosphorylierung von mIRS („*insulin receptor substrate*“) und die Rekrutierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (mPI3K) an die Zellmembran, wo diese daraufhin Phosphatidylinositole (PI-3,4-P₂) phosphoryliert (Katso *et al.*, 2001; Cantley *et al.*, 2002; White *et al.*, 2002). Die entstehenden Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate (PI-3,4,5-P₃) veranlassen die Lokalisierung von der Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (mPDK1) und der Proteinkinase mAKT (auch als Proteinkinase B bekannt) an die Membran. So wird mAKT durch mPDK1 phosphoryliert und aktiviert (Alessi *et al.*, 1997). In seiner aktiven Form phosphoryliert mAKT mTSC2 (Dan *et al.*, 2002). Zusammen mit mTSC1 bildet mTSC2 den mTSC-Komplex, der mTOR negativ reguliert. Bei einer Phosphorylierung von mTSC2 wird der mTSC-Komplex destabilisiert und ist inaktiv. Dementsprechend kann mTSC2 seine GAP („*GTPase-activating protein*“)-Aktivität auf die kleine GTPase mRHEB nicht ausüben (Castro *et al.*, 2003; Garami *et al.*, 2003; Inoki *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2003; Stocker *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Somit liegt mRHEB in seiner GTP-gebundenen Form vor und kann an die Kinase-Domäne von mTOR binden und diese aktivieren (Long *et al.*, 2005; Sancak *et al.*, 2007). mTSC2 wird auch durch die Kinase mERK1/2 („*extracellular signal-regulated kinase*“) in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt ebenfalls zur Dissoziation und damit zur Hemmung des mTSC-Komplexes (Roux *et al.*, 2004; Johannessen *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005). Somit wird mTOR auch über diesen Weg durch Wachstumsfaktoren positiv reguliert (Dan *et al.*, 2002; Inoki *et al.*, 2002, Manning *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 2002).

3.2.2.2 Aktivierung des TOR-Komplex 1 durch Nährstoffe

Die mTOR-Aktivität ist außerdem durch Nährstoffe, vor allem durch Aminosäuren, reguliert. Wie diese Regulation stattfindet, ist umstritten. Eine Studie deutet die Aktivierung von mTOR über die Inhibierung des mTSC-Komplexes an, da Zellen, in denen die mTSCs inaktiviert sind, resistent gegenüber Aminosäuremangel sind (Gao *et al.*, 2002). Allerdings zeigen andere Studien eingeschränkte mTOR-Komplex 1-Funktionen in mTSC-defizienten Zellen (Smith *et*

al., 2005). Möglich wäre auch, die Regulation von mTOR über mRHEB in Abhängigkeit von Aminosäuren. Dieses wird durch Beobachtungen unterstützt, bei denen mRHEB überproduziert wurde und mTOR-Funktionen trotz Aminosäuremangel stimuliert wurden (Garami *et al.*, 2003; Saucedo *et al.*, 2003). Außerdem ist die Bindung von mRHEB und mTOR abhängig von der Aminosäureverfügbarkeit (Long *et al.*, 2005).

Daneben ist vorstellbar ist, dass Aminosäuren direkt von dem mTOR-Komplex 1 wahrgenommen werden, da bei einem Mangel die Bindung von mTOR an mRAPTOR verändert wird (Kim *et al.*, 2002). Vor kurzem wurden RAG-GTPasen als weitere positive Regulatoren der mTOR-Komplex 1-Funktionen in Abhängigkeit von der Aminosäureverfügbarkeit identifiziert (Sancak *et al.*, 2008; siehe Kapitel 3.2.1.1.1).

3.2.2.3 Aktivierung des TOR-Komplex 1 durch einen hohen Energiestatus der Zelle

Der Einfluss des ATP-Levels der Zelle auf den TOR-Komplex 1 wird über die mAMPK („AMP-activated protein kinase“) vermittelt (Davies *et al.*, 1995; Dennis *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 2003; Hardie, 2004). Die AMP-aktivierte Kinase wird bei einem niedrigen Energielevel durch die Kinase mLKB1 aktiviert (Hardie, 2007). Aktiviertes mAMPK phosphoryliert mTSC2, welches eine Inaktivierung des mTOR-Komplex 1 zur Folge hat (Inoki *et al.*, 2003). Die mAMPK inhibiert auf diese Weise energieaufwendige Prozesse (z. B. Translation) und stimuliert ATP-produzierende Prozesse (z. B. Oxidation der Fettsäuren) (Shaw *et al.*, 2004).

3.2.2.4 Inaktivierung des TOR-Komplex 1 unter Stressbedingungen

Eine bedeutende Rolle nimmt mTOR unter verschiedenen Stressbedingungen ein. Bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) wird die Translation über die Hemmung von mTOR runterreguliert (Liu *et al.*, 2006; Schneider *et al.*, 2008). Dieses wird über mREDD1 („regulated in development and DNA damage 1“) vermittelt. mREDD1 reguliert den mTSC-Komplex positiv und somit mTOR negativ (Brugarolas *et al.*, 2004; Sofer *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2008). Außerdem führt Sauerstoffmangel, aufgrund einer eingeschränkten Atmungskette und somit reduzierten ATP-Synthese, zu einer Aktivierung der mAMPK, welches ebenfalls zur Inaktivierung von mTOR führt (siehe Kapitel 3.2.2.3). Reduzierende Bedingungen, die durch einen möglichen Redox-Sensor in der FATC-Domäne wahrgenommen werden, führen zu einer Hemmung der mTOR-Komplex 1-Funktionen (Dames *et al.*, 2005; Sarbassov und Sabatini, 2005). DNA-Schäden aktivieren den Transkriptionsfaktor p53, welche die Expression von Genen induziert, die an der Zellzykluskontrolle, der DNA-Reparatur und der Apoptose beteiligt sind (Lane *et al.*, 1994).

Über den mAMPK-mTSC2-Weg wird durch mP53 die Aktivität von mTOR inhibiert (Feng *et al.*, 2005).

Die Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung des TOR-Signalweges in Säugern.

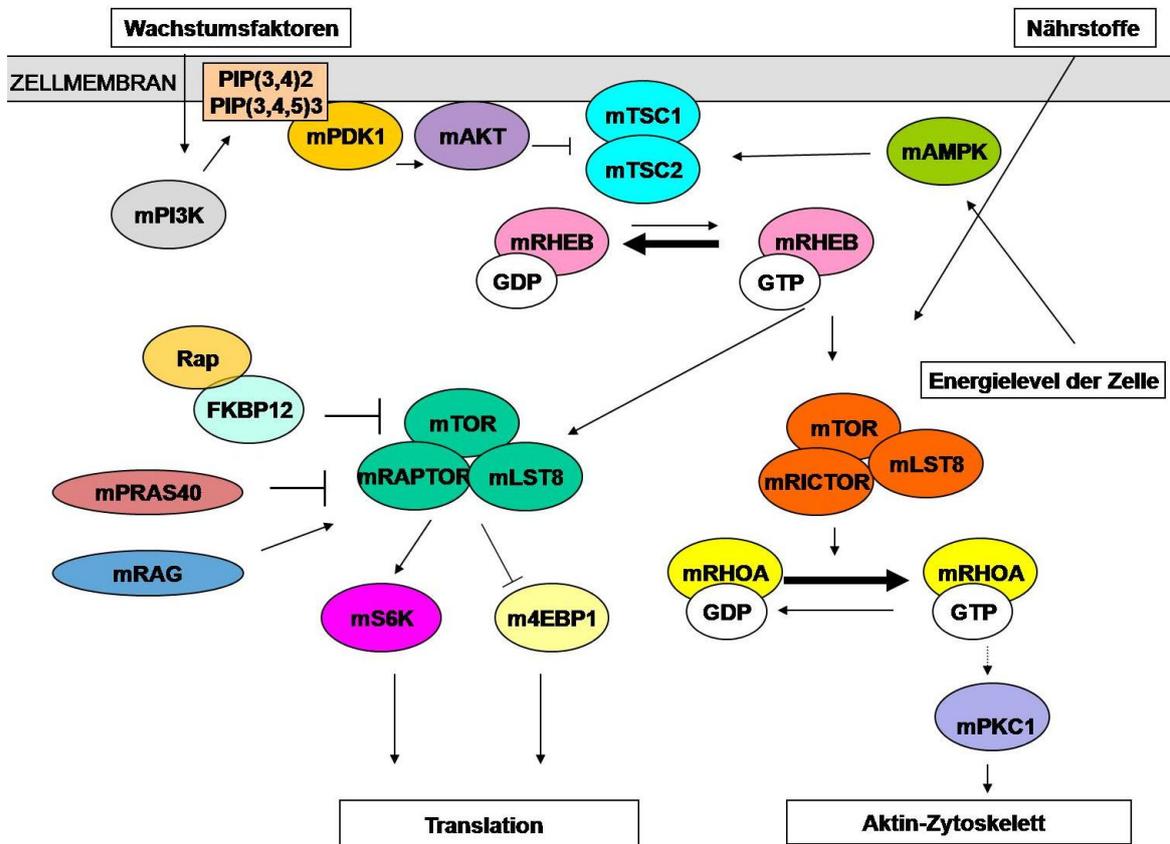


Abbildung 3. 2: Der TOR-Signalweg in Säugern ist hier vereinfacht dargestellt. Erläuterungen siehe Text.
R: Rapamycin

3.2.3 Bedeutung von AGC-Kinasen in dem TOR-Signalweg

Bei AGC-Kinasen („protein kinase A/ protein kinase G/ protein kinase C“) handelt es sich um konservierte, konventionelle eukaryotische Proteinkinasen (Hanks und Hunter, 1995; Gold *et al.*, 2006). Generell sind AGC-Kinasen für das Zellwachstum, die Proliferation und das Überleben unter Stressbedingungen zuständig. Wie andere Proteinkinasen haben sie einen katalytischen Kern mit einem charakteristischen Aufbau: An dem N-terminalen Bereich binden die Nukleotide, während C-terminal die Substrate gebunden werden und die Katalyse stattfindet. Diese beiden Bereiche werden durch den „T-loop“ verbunden. Es gibt ein allgemeines Schema für die Regulation dieser Kinasen. Dabei wird eine AGC-Kinase zunächst in der Aktivierungsschleife meist durch PDK1 phosphoryliert, worauf die Aktivierung durch eine oder mehrere Phosphorylierungen, oft über TOR vermittelt, am C-

Terminus folgt (Nolen *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 2006; Kannan *et al.*, 2007; Nolen *et al.*, 2007). Meistens werden AGC-Kinasen im HM („hydrophobic motif“) von TOR-Proteinen oder HM-Kinasen phosphoryliert (Biondi *et al.*, 2003; Biondi *et al.*, 2004; Dong und Liu., 2005; Gold *et al.*, 2006). Im C-Terminus befinden sich weitere putative Phosphorylierungsstellen (Yonemoto *et al.*, 1997; Dennis *et al.*, 1998; Saitoh *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2007). Die Phosphorylierungen am C-Terminus von AGC-Kinasen sind für die katalytische Aktivität, Stabilität und Lokalisation entscheidend (Keranen *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1995; Tsutakawa *et al.*, 1995). Das Zusammenspiel von einer TOR-Kinase und einer PDK1-Kinase, das letztendlich die Aktivität einer AGC-Kinase zu reguliert, wird als TOR-PDK1-AGC-Modul bezeichnet und ist sowohl in *S. pombe*, in *S. cerevisiae* als auch in Säugern zu finden (Matsuo *et al.*, 2003; Jacinto und Lorberg, 2008). In Säugern finden sich auch AGC-Kinasen als Zielproteine für mTOR, wie z. B. die bereits erwähnten Proteine mS6K, mPKC und mAKT (Burnett *et al.*, 1998; Parekh *et al.*, 1999; Sarbassov *et al.*, 2005). Auch in *S. cerevisiae* wurden einige AGC-Kinasen als ScTOR1/ScTOR2-Effektoren postuliert. Hierzu zählen neben ScPKC1 ScSCH9 und ScYPK1/2 (Kamada *et al.*, 2005; Urban *et al.*, 2007).

3.2.4 Lokalisierung der TOR-Komplexe

Lokalisationsstudien weisen darauf hin, dass mTOR bzw. die mTOR-Komplexe in verschiedenen Zellkompartimente zu finden sind. mTOR bewegt sich in Abhängigkeit von Nährstoffen zwischen Cytoplasma und Zellkern hin und her (Kim und Chen, 2000; Desai *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002; Drenan *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006). Unter guten Nährstoffbedingungen ist mTOR im Zellkern lokalisiert und reguliert dort die Synthese von 35S-rRNA (Li *et al.*, 2006). In vielen Zelllinien ist mTOR auch am endoplasmatischem Retikulum (ER) und am Golgi-Apparat lokalisiert (Drenan *et al.*, 2004). Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass die beiden Regulatoren von mTOR - mTSC2 und mRHEB - ebenfalls in denselben Kompartimenten vorhanden sind und die entsprechende Lokalisation von mRHEB für die Stimulation von mTOR erforderlich ist (Wienecke *et al.*, 1996; Buerger *et al.*, 2006). Die Assoziation mit dem ER und am Golgi-Apparat wird über ELS („ER localization signal“) und GLS („golgi localization signal“) vermittelt, die sich in zwei „HEAT-repeats“ und zwei IUS (interunit spacers“-Sequenzen befinden. Diese Signalsequenzen und damit die Lokalisation von mTOR sind für die Funktionen sowohl des mTOR-Komplex 1 als auch des mTOR-Komplex 2 notwendig (Liu und Zheng, 2007).

Auch in *S. cerevisiae* belegen diverse Studien, dass es sich bei ScTOR1 und ScTOR2 um periphere Membranproteine handelt. Dabei assoziieren diese sowohl an die Plasmamembran

als auch an integralen Membranen und nehmen damit möglicherweise eine Rolle im Endozytoseweg ein (Cardenas und Heitmann, 1995; Kunz *et al.*, 2000; Wedamann *et al.*, 2003). Auch andere Studien zeigen die Lokalisation an Membranen, in denen Proteine vorhanden sind, die bei der Aktin-Zytoskelett-Organisation und Endozytose beteiligt sind. Genetische Analysen haben eine funktionelle Interaktion derer, wie z.B. ScSLT2 und ScSLA2, mit Komponenten des mTOR-Komplex 1 bestätigt (Aronova *et al.*, 2007). Auch vermitteln möglicherweise „HEAT-repeats“ von ScTOR diese Lokalisation, da die Deletion dieser in ScTOR2 die Membranständigkeit verhindert (Kunz *et al.*, 2000). Entsprechend ihren unterschiedlichen Funktionen sind die beiden TOR-Komplexe in der Zelle unterschiedlich lokalisiert (Huh *et al.*, 2003; Araki *et al.*, 2005; Berchthold und Walther, 2009). Mikroskopische Aufnahmen mit ScTOR-3XGFP bzw. ScKOG1-GFP zeigen, dass diese ScTOR-Komplex 1-Mitglieder diffus im Cytoplasma und konzentriert an der Vakuolenmembran vorliegen (Sturgill *et al.*, 2008; Berchthold und Walther, 2009). Mittels Immunfluoreszenzaufnahmen und subzellulärer Fraktionierung stellte eine andere Arbeitsgruppe fest, dass sich ein großer Teil von ScTOR1 in der nukleären Fraktion befindet. Dieser Anteil wird durch die Nährstofflimitation oder Rapamycinzugabe vermindert. Unter diesen Bedingungen wird ScTOR1 aus dem Zellkern ins Cytoplasma exportiert (Li *et al.*, 2006). ScTOR2-3XGFP und die anderen TOR-Komplex 2-Mitglieder sind bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen auch im Cytoplasma, jedoch vor allem an der Plasmamembran, zu erkennen (Sturgill *et al.*, 2008; Berchthold und Walther, 2009). Diese Lokalisierung unterliegt einer gewissen Dynamik, die von lateralen Bewegungen geprägt ist. Dabei befindet sich der TOR-Komplex 2 in einem als MCT („membrane compartment containing TORC2“) bezeichneten Kompartiment. Die Membranassoziation wird hier durch die C-terminale Domäne des TOR-Komplex 2 Mitglieds ScAVO1 vermittelt und ist essentiell für die Viabilität von *S. cerevisiae* (Berchthold und Walther, 2009).

3.3 Der TOR-Signaltransduktionsweg in *Schizosaccharomyces pombe*

3.3.1 *S. pombe* als Modellorganismus

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*) wurde als Organismus ausgewählt, um den TOR-Signaltransduktionsweg zu untersuchen. Die Spaltheefe *S. pombe* wurde der knospenden Hefe *S. cerevisiae* bevorzugt, da diese, im Gegensatz zur Bäckerhefe, einen TSC-Komplex besitzt. (Mach *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002). Dieser Komplex ist ein wichtiger regulatorischer Bestandteil des TOR-Weges. Außerdem konnte bei dem Verlust von ScRHEB kein Effekt auf

den Zellzyklus beobachtet werden (Urano *et al.*, 2000). Hefen sind relativ einfach zu kultivieren, genetisch zu manipulieren und zeigen trotzdem die Charakteristika aller Eukaryonten. Erstmals isoliert wurde *S. pombe* von Lindner (1893) aus einem, mit Hirse gebrauten, ost-afrikanischem Bier, welches „Pombe“ genannt wird. Zuckerreiche Säfte (Trauben, Äpfel, Zuckerrohr) sind das natürliche Habitat von *S. pombe*. Der heutige, haploide Laborstamm leitet sich von einem, aus Traubensaft isolierten, Stamm ab (*Schizosaccharomyces liquifaciens*, isoliert von H. Osterwalder, 1924). Ist genügend Glukose und Stickstoff vorhanden, vermehren sich diese Hefen rein vegetativ. Bei schlechten Nährstoffbedingungen arretiert *S. pombe* in der G1-Phase und es kommt zur Konjugation von Zellen unterschiedlichen Paarungstyps (h^+ und h^-). Aus den daraus entstehenden diploiden Tetraden, bilden sich letztendlich Sporen, die ein Überleben unter diesen Bedingungen sichern.

3.3.2 Der TOR-Weg in *S. pombe*

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, besitzt *S. pombe* die für SpTsc1 und SpTsc2 kodierenden Gene (van Slegtenhorst *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 2002;). Wie auch in Säugern, wurde eine Interaktion dieser beiden Proteine und die Bildung eines SpTSC-Komplex nachgewiesen (van Slegtenhorst *et al.*, 1997). *S. pombe* $\Delta tsc1$ - oder $\Delta tsc2$ -Deletionsmutanten sind nicht in der Lage, auf das Paarungspheromon, den P-Faktor, zu antworten und haben daher eine niedrigere Konjugationseffizienz als der Wildtyp. Somit spielt der TSC-Komplex eine Rolle bei der Konjugation (Matsumoto *et al.*, 2002). Zudem zeigen $\Delta tsc1$ - oder $\Delta tsc2$ -Deletionsmutanten Defekte bei der Induktion bestimmter Gene, wie z. B. $sxa2^+$ und $fnx1^+ mei2^+$, die normalerweise bei Stickstoffhunger induziert werden (Matsumoto *et al.*, 2002; Nakase *et al.*, 2006). Außerdem zeigen Mutanten ohne funktionelles SpTsc1 und SpTsc2 eine verminderte Aufnahme der Aminosäuren Leucin und Arginin, was möglicherweise die Folge von delokalisierten Aminosäurepermeasen, wie bei der Permease Spc359.03 oder SpCat1-einem Transporter für kationische Aminosäuren- ist. Eine weitere Ursache der Aufnahmedefekte ist die verminderte Expression der Aminosäurepermeasen-kodierenden Gene $7G5.06^+$, $c869.10^+$ und $isp5^+$ in $\Delta tsc1$ - oder $\Delta tsc2$ -Deletionsmutanten (Matsumoto *et al.*, 2002; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Nakase *et al.*, 2006; Aspuria *et al.*, 2007). Aufgrund dieser Aminosäureaufnahme-Defekte zeigen $\Delta tsc1/\Delta tsc2$ -Mutanten eine höhere Resistenz gegenüber den toxischen Aminosäureanaloga von Arginin und Lysin -Canavanin und Thialysin (van Slegtenhorst *et al.*, 2004). Zellen, in denen eine hyperaktive Form von SpRhb1, dem homologen Protein zu mRHEB aus Säugern, produziert wird, zeigen einen ähnlichen

Phänotyp. Mutanten hingegen, in denen SpRhb1 nicht mehr funktionell ist, sind aufgrund einer gesteigerten Arginin-Aufnahme hypersensitiv gegenüber Canavanin. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass der TSC-Komplex SpRhb1 negativ reguliert (Yang *et al.*, 2001; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2005; Nakase *et al.*, 2006). SpRhb1 bindet und aktiviert in seiner GTP-gebundenen Form SpTor2 (Urano *et al.*, 2005; Uritani *et al.*, 2006). Diese funktionellen Zusammenhänge zwischen SpTsc, SpRhb1 und SpTor2 werden auch als SpTsc-SpRhb1-SpTor-Modul bezeichnet, welches mittlerweile auch in Säugern bekannt ist. Dieses wird durch die Tatsache bekräftigt, dass der Aminosäure-Aufnahme-Defekt von *tsc2*-Mutanten durch eine verminderte SpTor2-Aktivität aufgehoben werden kann (Matsuo *et al.*, 2007).

In *S. pombe* sind zwei TOR-Kinasen vorhanden: SpTor1 und SpTor2. Im Gegensatz zu *tor1*⁺ ist *tor2*⁺ essentiell (Weisman und Choder, 2001). SpTor1 ist für das vegetative Wachstum nicht erforderlich, aber bedeutend für das Wachstum unter Hunger- oder Stressbedingungen (niedriger und hoher pH-Wert, osmotischer Stress, hohe Temperatur, bestimmte Substanzen einschließlich Hydroxyurea) (Kawai *et al.*, 2001; Weisman und Choder, 2001). Bei einer *Δtor1*-Mutante ist bei Stickstoffmangel der G1-Arrest und die sexuelle Entwicklung gestört (Weisman *et al.*, 2007). Außerdem zeigen sich Defekte in der Aufnahme von Leucin (Weisman *et al.*, 2005), wie sie auch in *tsc1/2*-Mutanten zu sehen sind (Matsumoto *et al.*, 2002; van Slegtenhorst *et al.*, 2004). Diese Defekte korrelieren mit einer verminderten Expression der Aminosäurepermeasen *7G5.06*⁺, *isp6*⁺, *c869.10*⁺ in Medium mit Ammonium als Stickstoffquelle (Weisman *et al.*, 2005). Zumindest hinsichtlich der Regulation der Aminosäureaufnahme scheinen SpTsc1/2 und SpTor1 auf zwei parallelen Wegen zu agieren: Sie regulieren die Aufnahme jeweils positiv über die Expression der entsprechenden Aminosäurepermeasengene. Außerdem sind für das Wachstum auf einer „schlechten“ Stickstoffquelle, wie z. B. Prolin oder Harnstoff, entweder SpTor1p oder SpTsc1/2 notwendig (Weisman *et al.*, 2007). Ebenso wurde eine Bedeutung von SpTor1 für die Mitose beschrieben (Peterson und Nurse, 2007). Falls Nährstoffmangel oder die Zugabe von Rapamycin zu einer eingeschränkten SpTor1-Funktion führt, wird die Kinase SpGcn2, ein Translationregulator, aktiviert. Aktiviertes SpGcn2 führt wiederum zu einem niedrigeren Level an SpPyp2 (Peterson und Nurse, 2007). SpPyp2 ist eine Phosphatase, die die Aktivität von SpSty1 negativ reguliert (Gaits and Russell, 1999). SpSty1 ist die MAP-Kinase („mitogen activated protein kinase“) des SAPK-Weges („stress activated protein kinase“) in *S. pombe*. Dieser wird von SpSty1 zusammen mit der MAP-Kinase-Kinase SpWis1 und MAP-Kinase-Kinase-Kinase SpWak1 und SpWin1 gebildet (Warbrick and Fantès, 1991, Millar *et al.*, 1995;

Shiozaki and Russel, 1995; Kato *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1997; Samejima *et al.*, 1998). Die Aktivierung von SpSty1 unter Nährstoffmangel bzw. bei Rapamycin-Zugabe veranlasst die Lokalisation der Polo Kinase SpPlo1 zu den Spindelpolkkörpern. SpPlo1 aktiviert SpCdc2, die katalytische Untereinheit des MPF („mitosis promoting factor“), und somit den Eintritt in die Mitose (Mulvihill *et al.*, 1999; MacIver *et al.*, 2003; Petersen und Hagan, 2005; Petersen und Nurse, 2007; Hagan, 2008). Neuere Studien bestätigen die Regulation der Mitose durch die verschiedenen Aktivitätslevel von SpSty1 in Abhängigkeit von Nährstoffen. Dabei sind SpTor1, SpMip1 und SpGad8 notwendig, während SpSte20 und SpSin1 keinen Einfluss auf den Eintritt in die Mitose, als Antwort auf Nährstoffmangel, nehmen (Hartmuth und Petersen, 2009).

SpTor2 ist für das vegetative Wachstum essentiell (Kawai *et al.*, 2001; Weisman und Choder, 2001). Es reguliert den Wechsel zwischen Wachstum und Zelldifferenzierung je nach Nährstoffverfügbarkeit. Unter guten Nährstoffbedingungen reprimiert SpTor2 die sexuelle Entwicklung auf zwei Ebenen: Vor der Paarung durch Inhibierung von SpSte11 und vor der Meiose durch Inaktivierung von SpMei2. Eine Bindung von SpTor2 an diese beiden Proteine konnte nachgewiesen werden (Alvarez und Moreno, 2006). Sowohl der Transkriptionsfaktor SpSte11 als auch das RNA-Bindeprotein SpMei2 sind wichtige regulatorische Proteine für die sexuelle Differenzierung in *S. pombe* (Shimoda *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1988; Sugimoto *et al.*, 1991). Temperatursensitive *tor2*-Mutanten verhalten sich auch unter guten Nährstoffbedingungen wie Wildtyp-Zellen unter Stickstoffmangel. Sie arretieren in der G1-Phase als kleine, runde Zellen und initiieren deren sexuelle Entwicklung. Die Expression verschiedener Gene wird induziert, darunter Zellzyklus-Inhibitoren und Gene, die normalerweise bei Stickstoffhunger angeschaltet werden (wie zum Beispiel *isp6*⁺, *fnx1*⁺, *mei2*⁺ und *ste11*⁺). Dabei bleibt die Expression der Gene unverändert, die bei Glukose-Hunger angeschaltet werden (Alvarez und Moreno, 2006; Uritani *et al.*, 2006; Matsuo *et al.*, 2007; Weisman *et al.*, 2007). Des Weiteren wird in *tor2-ts*-Mutanten die Expression von Genen, die für Aminosäurepermeasen, wie z. B. SpIsp5, SpAC869.10c, SpAC11D3.18c, SpAC1039.01, SpBPB2B2.01 oder SpMam1, kodieren, angeschaltet (Matsuo *et al.*, 2007). Wie in *tsc1/2*⁺-Mutanten führt die Überexpression von *tor2*⁺ zu einer Resistenz gegen die toxischen Aminosäureanaloga Canavanin (Arginin-Analogon) und Thialysin (Lysin-Analogon) (Matsumoto *et al.*, 2002, van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2005). Unter Stickstoffmangel verhalten sich sowohl *tor2-ts*-Mutanten als auch *rhb1* Mutanten wie Wildtyp-Zellen unter Stickstoffmangel (Mach *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Tabancy *et al.*, 2003).

Betrachtet man die Phänotypen von *Δtor1* und *tor2-ts*-Mutanten, so kann man die ersten als „never starved for nitrogen“ und die letzteren als „always starved for nitrogen“ bezeichnen (Weisman *et al.*, 2007). Die Mutanten repräsentieren also jeweils den gegensätzlichen Phänotyp bezüglich der Antwort auf Stickstoffhunger. Die Doppelmutante *Δtor1 tor2-ts* zeigt jedoch keine Suppression von einem der beiden Phänotypen, sondern additive Defekte. So wird beispielsweise SpTor1 in Abwesenheit von SpTor2 zur Zellproliferation benötigt, während bei einer *Δtor1*-Mutante hier keine Auswirkungen zu erkennen sind (Uritani *et al.*, 2006; Matsuo *et al.*, 2007).

Der TOR-Signaltransduktionsweg in *S. pombe* ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt.

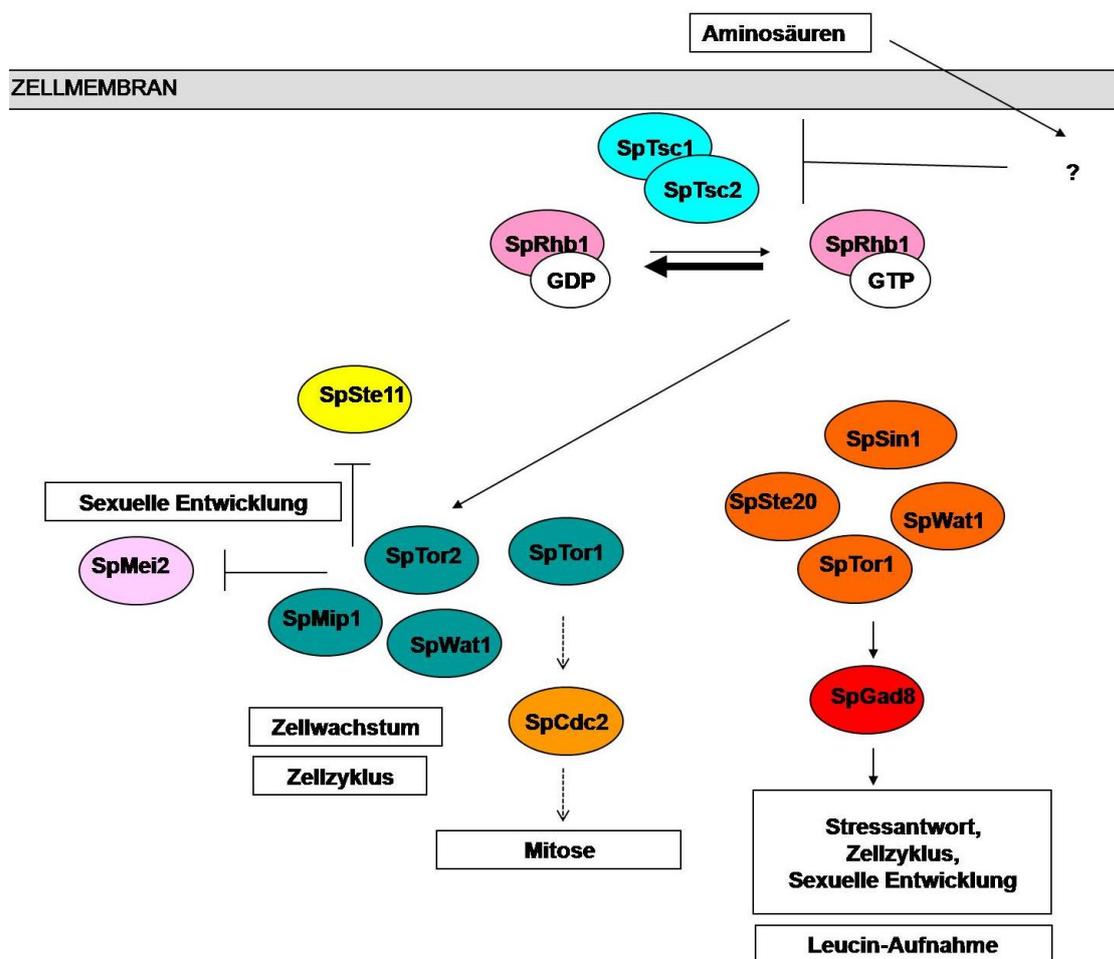


Abbildung 3.3: Der TOR-Signalweg in *S. pombe* ist hier vereinfacht dargestellt.

3.3.3 Zielproteine von SpTOR

Das einzige bisher postulierte Zielprotein der SpTOR-Kinasen ist die Proteinkinase SpGad8, welche von SpTor1 phosphoryliert wird. In *S. pombe* sind 106 Proteinkinasen vorhanden, von denen 20 zu den AGC-Kinasen gehören (Bimbo *et al.*, 2005; Miranda-Saavedra und Barton, 2007). Wie viele TOR-Zielproteine in Säugern und *S. cerevisiae*, gehört SpGad8 zu der Familie der AGC-Kinasen (Matsuo *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2008).

3.3.3.1 Das SpTor1-Zielprotein SpGad8

SpGad8 („G1-arrest defective 8“) wurde als „high copy suppressor“ der Sterilität und des temperatursensitiven Wachstums einer Mutante mit einer verkürzten Variante von SpTor1 isoliert (Matsuo *et al.*, 2003). SpGad8 ist eine Serin/Threonin-Kinase. Deletionsmutanten zeigen aufgrund ihrer Defekte bezüglich der sexuellen Entwicklung, dem G1-Arrest und der Stressantwort (bei osmotischem und Hitzestress) einen ähnlichen Phänotyp wie $\Delta tor1$ -Mutanten (Kawai *et al.*, 2001; Weisman und Choder, 2001). Dies deutet an, dass die entsprechenden Proteine, SpGad8 und SpTor1, in demselben Signalweg fungieren. Da die Überexpression von $gad8^+$ die Defekte von $\Delta tor1$ -Mutanten aufheben kann, SpTor1 jedoch nicht in der Lage ist, den $\Delta gad8$ -Phänotyp zu supprimieren, kann man davon ausgehen, dass SpGad8 unterhalb von SpTor1 agiert (Matsuo *et al.*, 2003). SpGad8 wird durch SpTor1 an mindestens zwei Serinresten (Ser527 im „turn motif“ und Ser546 in HM) phosphoryliert. SpKsg1 phosphoryliert SpGad8 an einem Threoninrest (Thr387 im „activation loop“). Beide Phosphorylierungen regulieren die Kinase-Aktivität von SpGad8, was vermuten lässt, dass das Zusammenspiel von SpTor1, SpKsg1 und SpGad8 eine Art Modul zur Regulation von sexueller Entwicklung und Wachstum unter Stressbedingungen darstellt (Matsuo *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2008).

3.4 Rapamycin

Wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben bindet Rapamycin an TOR-Proteine. Rapamycin wird als Sekundärmetabolit von *Streptomyces hygroscopicus* produziert (Vezina *et al.*, 1975). Es wird als Immunsuppressivum eingesetzt, welches die Proliferation von T-Helferzellen inhibiert (Tocci *et al.*, 1989).

Gelangt Rapamycin in eine *S. cerevisiae*- oder eine Säugierzelle, bindet es zunächst an das FK506-Bindeprotein (FKBP), um dann als Komplex mit diesem an die FRB („FKBP-rapamycin-binding“-)Domäne des TOR-Proteins zu binden und dieses zu inhibieren (Abbildung 3.1; Heitmann *et al.*, 1991; Koltin *et al.*, 1991; Bram *et al.*, 1993; Kunz *et al.*,

1993; Helliwell *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1996). Dabei wird sowohl in Säugern als auch in *S. cerevisiae* das vegetative Wachstum und der Zellzyklus in der G1-Phase beeinträchtigt (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Cutler *et al.*, 1999; Dennis *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2000; Schmelzle und Hall, 2000; Loewith *et al.*, 2002; Edinger *et al.*, 2003; Jacinto *et al.*, 2004; De Virgilio and Loewith, 2006). Durch die Inhibition von mTOR bzw. ScTOR1/ScTOR2 wird die Aktivität bestimmter Zielproteine beeinflusst. In Säugern wird die Interaktion von mTOR und mRAPTOR geschwächt, was die Funktionen des mTOR-Komplex 1 beeinträchtigt. So wird die Aktivierung der mS6-Kinase durch Rapamycin inhibiert (Calvo *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 1992; Kuo *et al.*, 1992; Price *et al.*, 1992; Ferrari *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2002). Dadurch wird die Proteinsynthese eingeschränkt, ebenso wie durch eine Hemmung von mIF-4E (Lin *et al.*, 1995; Berreta *et al.*, 1996; Brunn *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung des Translationsregulators m4EBP1 hingegen wird bei einer 24 h Behandlung mit Rapamycin, im Gegensatz zur mS6-Kinase, nur in den ersten 3 h inhibiert (Edinger *et al.*, 2003; Choo *et al.*, 2008; Feldman *et al.*, 2009). Außerdem kann mTOR unter Rapamycin-Zugabe die CREM („cAMP-responsive elements modulators“)-Transkriptionsfaktoren nicht mehr aktivieren (de Groot *et al.*, 1994). Den Zellzyklus beeinträchtigt Rapamycin über bestimmte CDKs („cyclin-dependent kinases“) und CDK-Inhibitoren. So wird der Abbau des CDK-Inhibitors mKIP1 durch Rapamycin gehemmt. Dieses verhindert eine Aktivierung der CDKs mCDC2 und mCDK2 (Morice *et al.*, 1993; Nourse *et al.*, 1994; Barbet *et al.*, 1996). Der mTOR-Komplex 2 galt zunächst als insensitiv gegenüber dem Immunsuppressivum Rapamycin, da weder die Bindung von mTOR und mRICTOR noch die mTOR-Kinaseaktivität des mTOR-Komplex 2 gestört wird, wenn die Rapamycinbehandlung in dem zeitlichen Rahmen durchgeführt wird, in dem mTOR-Komplex 1-Funktionen bereits inhibiert werden. Erfolgt die Rapamycin-Zugabe jedoch über einen längeren Zeitraum (mindestens 24 h), so wird auch hier die Interaktion von mTOR und mRICTOR geschwächt und dadurch in bestimmten Zelltypen (z. B. PC3-Zellen) die Phosphorylierung von mAKT verhindert (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2006). Die Organisation des Aktin-Zytoskeletts über den mTOR-Komplex 2 wird durch Rapamycin nicht beeinflusst (Jacinto *et al.*, 2004). Auch mFKBP12-eigene Funktionen werden gehemmt, wie z. B. die Ca²⁺-Freisetzung durch Ryanodin-Rezeptor-Kanäle (Brillantes *et al.*, 1994; Lehnart *et al.*, 2003).

In *S. cerevisiae* kommt es bei Rapamycin-Zugabe zum Erliegen des Zellwachstums. Die Zellen arretieren in der frühen G1-Phase. Dieses wird durch eine eingeschränkte Translation von z. B. dem G1-Cyclin ScCLN3 vermittelt (Heitman *et al.*, 1991; Koltin *et al.*, 1991; Barbet

et al., 1996). Diese ScTOR-Komplex 1-Funktionen werden inhibiert ohne dabei die Bindung von ScKOG1 an ScTOR1 zu verhindern (Loewith *et al.*, 2002). Rapamycin hat keine Auswirkungen auf die vom ScTOR-Komplex 2 kontrollierte Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Zheng *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996). Ebenso wird die FKBP12-abhängige, ScTOR1/2-unabhängige, Aspartokinase in *S. cerevisiae* durch Rapamycin gehemmt (Alarcon und Heitman, 1997).

In *S. pombe* dagegen hemmt Rapamycin weder das vegetative Wachstum, noch den Eintritt in die stationäre Phase. Die Zugabe dieses Immunsuppressivums inhibiert jedoch die sexuelle Entwicklung zu einem Zeitpunkt vor der Konjugation der haploiden Zellen bei Nährstoffmangel, während es keinen Effekt auf die Sporulation von Diploiden hat (Weisman *et al.*, 1997). Dieser Defekt wird möglicherweise über SpFkh1, das homologe Protein in der Spaltheife zu FKBP12 aus Säugern, vermittelt. Mutationen in dem entsprechenden Gen *fkh1*⁺ führen ebenfalls zu einer eingeschränkten sexuellen Entwicklung (Weisman *et al.*, 2001). Daher wurde der, unter Rapamycin-Zugabe beobachtete, Phänotyp zunächst als direkte Wirkung von Rapamycin auf SpFkh1 gedeutet. Zunächst konnte keine Bildung eines Rapamycin-SpFkh1-SpTor1/SpTor2 Komplexes nachgewiesen werden. In den letzten Jahren ergaben sich allerdings zahlreiche Hinweise darauf, dass TOR auch in *S. pombe* ein Zielprotein von Rapamycin sein könnte. So ist die, durch SpTor1 gesteuerte, Leucin-Aufnahme Rapamycin-sensitiv. Dieses korreliert mit einer verminderten Expression von drei Aminosäurepermeasen-Genen: *7G5.06*⁺, *isp5*⁺ und *c869.10*⁺. Die Rapamycin-Sensitivität wurde durch Mutationen in *wis1*⁺ oder *spc1*⁺ unterdrückt (Weisman, 2004; Weisman *et al.*, 2005). Die entsprechenden Proteine SpWis 1 und SpSpc1 gehören zu der Stress-aktivierten MAP-Kinase-Kaskade, der eine Rolle in der Aminosäureaufnahme zugeordnet wird (Karagiannis *et al.*, 1999). Der Verlust des Transkriptionsfaktors SpAtf1, der durch SpSpc1 aktiviert wird, ändert jedoch nichts an der Rapamycin-Sensitivität der Leucinaufnahme. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass diese MAP-Kinase-Kaskade die Leucin-Aufnahme unabhängig von SpAtf1 beeinflusst (Shiozaki und Russel, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Weisman *et al.*, 2005). Des Weiteren wurde in einem Zwei-Hybrid-System eine Interaktion der FRB-Domäne von SpTor1 und SpFkh1 in Anwesenheit von Rapamycin beobachtet. Die Tatsache, dass *Ator1*-Mutanten eine SpFkh1-abhängige Sensitivität aufweisen, führt zu der Annahme, dass auch SpTor2-abhängige Funktionen betroffen sind (Weisman, 2004; Weisman *et al.*, 2005). Temperatursensitive *tor2*-Mutanten zeigen eine Hypersensitivität gegenüber Rapamycin (Hayashi *et al.*, 2007). Weitere Studien zeigen, dass Zellen nach Rapamycin-Zugabe einen ähnlichen Phänotyp wie *Atsc1/2*-Mutanten oder Zellen, in denen SpTor2

überproduziert wird, haben. Somit erhöht Rapamycin in diesem Fall die TOR-Aktivität im Gegensatz zu dessen Wirkung in anderen Organismen. Die beschriebenen Zellen- *Ats1/2*-Mutanten, SpTor2-Überproduzenten oder Zellen nach Rapamycin-Zugabe – sind jeweils resistenter gegenüber den toxischen Aminosäureanaloga Thialysin und Canavanin. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung des bereits beschriebenen Leucin-Aufnahme-Defekts bei Rapamycin-Zugabe (Matsumoto *et al.*, 2002; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Weisman *et al.*, 2007).

3.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die in Säugern und *S. cerevisiae* konservierten TOR-Komplexe auch in der Spaltheefe *S. pombe* existieren. Dies sollte mittels Ko-Immünpräzipitationsstudien der zu den mTOR-Komplex-Mitgliedern homologen Proteine geklärt werden. Phänotypische Analysen von Deletionsmutanten und Zellen, die SpTor1 bzw. SpTor2 überproduzieren, sollten die biochemischen Experimente ergänzen, um Aufschluss über die Konservierung und die Funktionen der TOR-Komplexe zu geben. Um die Konservierung der einzelnen TOR-Komplex-Proteine zu analysieren, wurde getestet, ob ein TOR-Komplex-Protein aus *S. pombe*, den Phänotyp der entsprechenden *S. cerevisiae*-Mutanten, in der das homologe Protein nicht mehr produziert wird, komplementieren kann. Über die Bindung von Rapamycin an die TOR-Proteine in *S. pombe* war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Hier sollten *in vivo* Experimente Erkenntnisse über eine mögliche Bindung von SpFkh1, dem *S. pombe* Homologen zu mFKBP12 aus Säugern, an SpTor1 und/oder SpTor2 in Anwesenheit von Rapamycin geben. Inwieweit die Bindung von SpFkh1 an SpTor1 bzw. SpTor2 die TOR-Zielproteine beeinflusst, war ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

Vorangegangene Experimente zeigten, dass die HR1-Domäne des TOR-Komplex 2-Proteins SpSte20 an SpClc1, der leichten Kette des Clathrins, bindet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob diese Interaktion auch in der nahe verwandten Bäckerhefe *S. cerevisiae* konserviert ist und welche Bedeutung sie einnimmt. Möglicherweise spielt sie für eine eventuelle Membranassoziation der TOR-Komplexe in *S. pombe*, wie sie bereits für Säuger und *S. cerevisiae* beschrieben wurde, eine Rolle.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien

Aceton (Roth), Adenin-Hemisulfat (Sigma), Adeninsulfat (Serva), Agar (BD), Agarose (Roche), „Agarose Gel DNA Extraction Kit“ (Roche), Albumin Fraktion V (Roth), Amilorid-Hydrochlorid-Hydrat (Sigma), 3-Amino-1,2,4-triazol (Sigma), Ammoniumacetat (Roth), Ammoniumchlorid (Roth), Ammoniumperoxodisulfat (APS, Roth), Ammoniumsulfat (Roth), Ampicillin-Natriumsalz (Roth), Arginin (Serva), Betain (Sigma), Bicin (Sigma), d-Biotin (Sigma), BioRad Protein Assay (Biorad), Borsäure (Aldrich), 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galaktopyranosid (x-Gal, Roche), Bromphenolblau (Applichem), Calciumchlorid-Dihydrat (Roth), „Calmodulin affinity resin“ (Stratagene), L-Canavanin (Sigma), Chloroform:Isoamylalkohol 24:1 (Sigma), Clonat (Nourseothricin, Werner BioAgents), „DIG Luminescent Detection Kit“ (Roche), „DNA Extraction Kit“ (#K0513, Fermentas), Dimethylsulfoxid (Roth), Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dihydrat (Roth), Di-Natrium-Hydrogenphosphat-Dodecahydrat (Roth), 1,4-Dithiothreitol (DTT, Roth), „ECL Western Blotting Detection“ (Amersham, Pierce), EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat (Roth), Eisenchlorid-Hexahydrat (Sigma), Essigsäure 100% D:1,05 (Roth), Ethanol (Roth), Ethidiumbromid (Roth), DL-Ethionin (Sigma), Ethylenglykol (Sigma), 5-Fluoro-Orotsäure (Biomol/USB biological), „Expand™ High Fidelity PCR System“ (Roche), „E.z.n.a. Gel Extraction Kit“ (Omega biotech), G418-Sulfat (Calbiochem), D(+)-Galaktose (Roth), Glasperlen ($\varnothing = 0,45 - 0,5$ mm; B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen), α -D(+)-Glukose Monohydrat (Roth), L-Glutamin (Sigma), Glutaminsäure (Sigma), Glutaraldehyd (Sigma), Glycerin (Roth), Glycin (Sigma), Hefeextrakt (BD) Heringssperma-DNA (Roche), L-Histidin Monochlorid Monohydrat (Sigma), Hybond TM-N Nylon Membran (Amersham Pharmacia Biotech), Hygromycin B (Merck Calbiochem), IgG-Sepharose (Amersham), myo-Inositol (Sigma), L-Isoleucin (Serva), Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid (IPTG, Roche), Isopropanol (Infracor GmbH), Kaliumacetat (Roth), Kaliumchlorid (Roth), Kalium-Dihydrogenphosphat (Roth), Di-Kalium-Hydrogenphosphat (Roth), Kalium Phthalat (Sigma), Kanamycin-Sulfat (Roche), Koffein (Sigma), Kupfersulfat-Pentahydrat (Sigma), L-Leucin (Roth), Lithiumacetat (Roth), L-Lysin Monohydrochlorid (Sigma), Lysozym (Roche), Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Roth), Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Roth), Malzextrakt (BD), Mangan-II-chlorid-Tetrahydrat (Roth), Mangan-2-Sulfat Monohydrat (Roth), Methanol

(Roth), 2-Mercaptoethanol (Sigma), L-Methionin (Serva), Molybdänsäure (Riedel-de Häen), MOPS (Roth), Natriumacetat (Roth), Natriumazid (Roth), Natriumchlorid (Sigma), Natriumfluorid (Sigma), Natrium-Dihydrogenphosphat-Dihydrat (Roth), Natriumhydrogencarbonat (Roth), Natriumhydroxid (Roth), Natriumsulfat (Roth), o-Nitrophenyl-B-D-Galaktopyranosid (Sigma), 4-Nitrophenylphosphat-Di(tris)Salz (Sigma), Natriumpyrophosphat (Sigma), Nonidet P40 (Fluka), Nikotinsäure (Sigma), Pantothersäure Hemicalciumsalz (Sigma), Pepton (BD), L-Phenylalanin (Serva), Polyethylenglykol 4000 (PEG4000, Roth), Polyethylenglykol 1000 (PEG1000, Fulka), Phenol:Chloroform 5:1 (Sigma), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Roth), „Phos-tag Acrylamide AAL-107“ (NARD Institute), L-Prolin (Sigma), „Protease Inhibitor Cocktail“-Tabletten (Roche), Protein-G-Sepharose (Sigma), Protan BA Nitrocellulose-Membran (Whatman, Dassel), Raffinose (MP Biomedicals), Rapamycin (LC Laboratories), Roti-Phenol (Roth), Rotiphorese Gel A (Acrylamidlösung 30%, Roth), Rotiphorese Gel B (Bisacrylamidlösung 2%, Roth), Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid, 0,8 % (w/v); Bisacrylamidlösung 30 % (w/v); 37,5:1, Roth), Rotiphorese Gel Nf 30% (Acrylamid, 0,8 % (w/v); Bisacrylamidlösung 30 % (w/v); 29:1, Roth), Rubidiumchlorid (Roth), Salzsäure 32% D:1,16 (Roth), Natriumdodecylsulfat (SDS, Roth), Sepharose CL-4B (Sigma), D-Sorbit (Roth), TEMED p.a.D: 0,78 (Roth), Thiamin-Hydrochlorid (Sigma), L-Threonin (Serva), Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Roth), Triton-X-100 (Roth), Trypton (BD), L-Tryptophan (Serva), Tween 20 (Roth), L-Tyrosin (Serva), Uracil (Sigma), L-Valin (Serva), Xylencyanol FF (Sigma), „Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids and Ammoniumsulfate“ (BD), Zinksulfat-Heptahydrat (Sigma), Zitronensäure-Monohydrat (Sigma).

4.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Roche), T4-Ligase (Roche), Proteinase K (Roche), Restriktionsenzyme (Fermentas, NEB, Roche), Ribonuklease A (Roche), Zymolyase (MP Biomedicals 32092).

4.1.3 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4. 1: Verwendete Antikörper. Die eingesetzten Konzentrationen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
anti-GFP (Roche)	anti-mouse IgG HRP-linked whole Ab, sheep (GE); Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)
anti-HA (Roche)	anti-mouse IgG HRP-linked whole Ab, sheep (GE); Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)
anti-c-Myc (Roche)	anti-mouse IgG HRP-linked whole Ab, sheep (GE); Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)
anti-Protein A (Sigma)	anti-rabbit IgG HRP-linked whole Ab, donkey (GE); IRDye 800CW conjugated goat (polyclonal) anti-rabbit IgG (Li-Cor)
monoclonal anti-A-Tubulin (Sigma)	anti-mouse IgG HRP-linked whole Ab, sheep (GE); Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)
PhosphoSerine Antibody Q7 (Qiagen)	Alexa Fluor 680 goat anti-mouse IgG (Invitrogen)

4.1.4 Oligonukleotide

Alle in Tabelle 4.2 aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert.

Tabelle 4.2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide. Eine gegebenenfalls vorhandene Schnittstelle ist unterstrichen.

Name	Sequenz
3'Avo1/Sin1	5'- GAT ATA AAC CAA AAT TAA TGC TGG TAA GAT GCA GTA TAA TGG GTT TTA CTT AAT TTA TTT TTT TAA CAG - 3'
3'Avo1Asp718I	5'- GCG <u>GGG</u> TAC CAT CGA GAT CGC GAT GAA GTA TTT TC - 3'
3'Avo3 SacI	5'- GCG <u>GGA</u> GCT <u>CTG</u> TAC AAG GAA ACC CCA TTA TTA TAT AAT G - 3'
3'Avo3-Ste20	5'- GGA ATA TTG TGA CTA TAT ACA TTT ATA CAT GCG GCC CTT TTT TGC TTC ATG CGG AAA TTG ACA AAT TAT TC - 3'
3'tor1-HA-Ü-PCR	5'- CAA GTG AAC GCT CAG TTC GC - 3'
3'tor2-HA-Ü-PCR	5'- GAG AGA GCA CGG TAA GAA GC - 3'
3' Oligo nach BamHI	5'- CAC CGT TCA AGT CTT CCT CG - 3'
3A vor Clc1 NdeI	5'- CCG TCG TCA AAG TCT TCT AAA GCC GGA AAT TGA GAC ATC <u>ATA TGG</u> GTG GTT GGT AAA GGT TGA AAG - 3'
5'Avo1 SphI	5'- GCG <u>GGC</u> ATG <u>CTG</u> GGT TGT ACT ACT GAC ATT TAC - 3'
5'Avo1/Sin1	5'- CAG TGT TTG TAA AAC CCC CAC CAC ACC ATA ATA AGA CGA TAA TGG AAT TAA CAA GAG AGA AAG - 3'
5'Avo3 Sall	5'- GCG <u>GGT</u> <u>CGA</u> CAT TTC AAC GGC AAG AGA GTT TG - 3'
5'Avo3-Ste20	5'- GCT TCG TGC TGT ACC GCT TCT ATT AAG TTT TTG AAA TTC ACA ATG AAA CCT GTG CGA AGG GG - 3'
5'tor1-HA-2.Ü-PCR	5'- CCA TAT CTC GGA GAA GTT AC - 3'
5'tor2-HA-2.Ü-PCR	5'- GTT TGG TCA CCA CCA ACC AC - 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'
FKH1-3überprüf	5'- CTG AAC GTG TAA TTT AAC T - 3'
ForwardKog1/mip1	5'- GCG AAT CCT ATT GCA TGC AGA GAA GGG TAA AAG ATA CAT AAT GAA TGA TAG AAT TAG TG - 3'
Gad8 intern 5'raus	5'- GCC CAC ATT GTA TCT CGC AG - 3'
GAD8-3 im Term	5'- CAC CTT TAA TTA CAT CTC CG - 3'
GAD8-3 Überprüf	5'- CGC TAA TAA AGT CGA ACA GG - 3'
GAD8-3BamHI	5'- GGC <u>GGA</u> <u>TCC</u> TCT TCC ATA ATG CTC GGT GG - 3'
Gad8-3BamHI neu	5'- GGC <u>GGA</u> <u>TCC</u> CGG TGG ATT GGC GCT CCA ACC - 3'
GAD8-5 im Prom	5'- GTA TTC GCT TAC TGG TAC AC - 3'
GAD8-5 überprüf	5'- CCT GCG TAA TGT GCC GAC CG - 3'
GAD8-5BamHI	5'- GGC <u>GGA</u> <u>TCC</u> <u>GGC</u> GAC TTT GCT CAA AGT CG - 3'
Gad8-5BamHI neu	5'- GGC <u>GGA</u> <u>TCC</u> CGA AGC ATT CCT TTA GTA GGG - 3'

Name	Sequenz
GAD8-F1	5'- AGT TCA TTT TTT TTT TCT ACT CCA AAC AGA CGT TAC CGA ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA - 3'
GAD8-F2	5'- CCA ATT GGA GCT ATC AAC GAC CAA CAA CCA TTG ATA CAT CGA CGA CAT TAA TAC AAT AGC ACC TGG AAG TGT CAT TAG GCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA - 3'
Gad8-F2 neu	5'- AAC CGT TCA ACA AAG GTT TGC CAA TTG GAG CTA TCA ACG ACC AAC AAC CAT TGA TAC ATC CGA CGA CAT TAA TAC AAT AGC ACC TGG AAG TGT CAT TAG GCG GAT CCC CGG GTT AAT TAA - 3'
GAD8intern HindIII	5'- CCG CAA GCT TGG ATT GTT GAC CCG CGC TCC - 3'
GAD8-R1	5'- AAA AGA TGA CAA TAA TGA GAA ATG AAC GAA GCT TTG GCC TTT ATA ACA TAC AAA TAT GTA AAA GAG GCA AGA AAA GCG GCG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
GADT7-3'	5'- GGG GTT TTT CAG TAT CTA CG - 3'
GBTT7-3'	5'- CAC TTT AAA ATT TGT ATA CAC - 3'
HGH-3'out	5'- CCG GAA TTC GGA GCG CGG CCG - 3'
hgh-5'out	5'- CCG GAG CCG GGA CTG TCG GGC - 3'
KanMX3'out	5'- CTT GAT GGT CGG AAG AGG C - 3'
KanMX5'out	5'- GGC TGG CCT GTT GAA CAA G - 3'
Lst8/Wat1 forward	5'- TGG CAG TCT TGT CAT CCA TAT AAA AAA GGA GTT CTG ATT GAT GTC A GT ACA GTA TCC ACC- 3'
LST8/wat1 reverse	5'- CAC TTC GGT CCT TCA AGC TTG GTA GTT GAT AAA TTG TAA ATT AAA TTT GGT AGT CAT TAA - 3'
Mip1-F2	5'- GTG GTG ATA ACA CAG ATA GTA GAG TTA ATC TAT ACT CTT GCA CCA AAA ACG AGA TTC ATA CGG ATT CGC CGA ACG AGT TTC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
Mip1-R1	5'- AGA CTA AGC AAA GTG GCA GGT TTA GCA AAA TAT GTA TAA TAA CCA AAT TAA GTG TTG CTA ATA GAA AGA AAA GTC TAA TCG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
Mip1intern	5'- CCT TCC GTG AAA ATC CAC - 3'
pGADT7-5'	5'- ACC ACT ACA ATG GAT GAT GT - 3'
Reverse	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG - 3'
ReverseKog1/mip1	5'- TTT GCA GCT AAA TGA AAG AAA AAA AAA GAA ATG GCA CAT ATT AAA ACT CGT TCG GCG AAT - 3'
SIN1-5neu	5'- GAT CCG AAG AAA CGT TGT C - 3'
SIN1-F1	5'- GTA TGG TCG CTA AGT ATT CAA ACT TCG TTG AAA TTA AAT ATT TTA TAA AGT CTG TAA ATG CGA TAT AAT AAG GAC TCA GAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
SIN1-F2	5'- TTG AAG TTT TGT CCG CCT TGG AAG CTG CCA TTA TAG TTA GCA GGA TAC GTG CAC TGA TGA ATA CTG TTA AAA AAA TAA ATC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
SIN1intern	5'- GGG AAA CTA AGC GGT AAG - 3'

Name	Sequenz
SIN1-R1	5'- ATG AAG ACG ATG AAG ATG AAG CTG ATT TTG AAG ATG TTT AAT AAA AAT GAC ATA GGG GAG AGA GCA ATG TGA TAC CAA AAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
sin1 vor IntronBamHI	5'- GGC GGG ATC CCA GTA TAC ATG CTG GAT CG - 3'
SpMip1-5SalI	5'- GGC GGT CGA CGT GAC TTG ATT GAC ATT GGC - 3'
SpSin1-3BamHI	5'- GGC GGG GAT CCG GTA TTA CTG ATG GTG ATA CGG - 3'
SpSin1-5HindIII	5'- GCT TGG CGT TGT CGA GTG - 3' (genomische <i>HindIII</i> - Site)
SpSte20- 5BamHI	5'- GGC GGG ATC CCT CAT CTT ATT CTC TTG C - 3'
SpSte20 intern	5'- CGG CAA CTA ACA AAG ATT C - 3'
SpSte20-3BamHI	5'- GGC GGG ATC CGC CCA AAC TCC ACG ATA TG - 3'
SpSTE20-F1	5'- GGA GAT AGC TTT TTT ATT CCT GCT TTT AAT GAT CAG TGC TCC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
SpSte20-F2	5'- ACT CGG TTT TAT TGT CTT CCT CAA CCT CAC AGG ACT TAA ATG AAT CCC CGT CCA GGC CGA ATA ATT TGT CAA TTT CCG CAC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
SpSte20-R1	5'- GAA GGT CAA AGA ATA AGC AGA AAA CTA AAG ATC AAA CTT ATT GAA TAA CAG AAG AAA AAC GAT AAT AAG AAA TCA TAA AAG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
SpTor1-3BamHI	5'- GCG GGG ATC CGC TGT ACA TCA TGA AAA ATA C - 3'
SpTor1-5BamHI	5'- GGC GGG ATC CCG GTA AAC AGT AGT ACG TAT G - 3'
SpTOR1-F1	5'- ATT GTG ATG AAT GCC TAA GTG GAA GAA TTG AAC ACC GCG ACT ATT AGA AAG TCT ATC GTT TCA CTC GCT CTC TTT GAT TCC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
SpTOR1-R1	5'- AAA AAG GTA AAA GAG AAG TCT CTT TGA AAT TTT TGA TGA GTA TGA GAA ATA AAA TAG TCA TCC AGG AAA AGA ATC ATA ACG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
SpWat1-3BamHI	5'- GGC GGG ATC CCT AAC CAG AAA GCT AAT G - 3'
SpWat1-5BamHI	5'- GGC GGG ATC CGA GCA CTA CTT CTC AAC TTG - 3'
SpWAT1-F2	5'- TAT CGA GTG GTG AAA CAA TCC GTC AGT ATT CGG GTC ATC ACA AAG CTG CTG TTT GTG TTG CTC TTA ATG ACT ACC AAA TTC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
SpWAT1-R1	5'- TGT TGA CAA GAC AAG ACT CTT GTT TTC CTA AGA AGA TTG GTG AAT AAA ATC TAT ATA GCA AAG GTA AAA TAG GAT AAA GGG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
STE20-3 PCR	5'- CGT TGC ATA CGT TGT ATG TGG - 3'
STe20-3mehr	5'- GTT ATG TAG TCA AAA GAG TG - 3'
Ste20-5 PCR	5'- CCG TTG GGG TAT CCA TGA GC - 3'

Name	Sequenz
Ste20-5neu	5'- GGC AAA GTC CAC TTA ACC - 3'
T7/GBTT7-5'	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC - 3'
tor1+-nmt1prom-3'	5'- TGC TTT CAT TTT TGT TTT TTA GAT CAC TAA AAT ACT CCA TGA TTT AAC AAA GCG ACT ATA - 3'
tor1+-nmt1prom-3HA-3'	5'- TGC TTT CAT TTT TGT TTT TTA GAT CAC TAA AAT ACT CCA TGC ACT GAG CAG CGT AAT CTG - 3'
tor1+-nmt1prom-5'	5'- CTA TTA GAA AGT CTA TCG TTT CAC TCG CTC TCT TTG ATT CGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC - 3'
TOR1-5neu	5'- GAT ACT GCT CTC TCC GGT G - 3'
TOR1-3HA-3'	5'- GAA TGC TTT CAT TTT TGT TTT TTA GAT CAC TAA AAT ACT CCA TGC ACT GAG CAG CGT AAT CTG G - 3'
TOR1-3HA-5	5'- CTA TTA GAA AGT CTA TCG TTT CAC TCG CTC TCT TTG ATT CAT GTT AAT TAA CAT CTT TTA CCC - 3'
TOR1-3vorATGBamHI	5'- GGC <u>GGG ATC</u> CGA ATC AAA GAG AGC GAG TG - 3'
TOR1-5HindIII	5'- CGT CAA TAA CCC ATA CAG - 3'
TOR1-ATGBamHI	5'- GGC <u>GGG ATC</u> CAT GGA GTA TTT TAG TGA TC - 3'
TOR1internSacI-3	5'- GGC <u>GGA GCT CCT</u> TTA CAG CAG CAG CCA AC - 3'
TOR1seq	5'- GCC AAT ACC TCT CCG GTC - 3'
TOR1-SnaBI-3'	5'- GTA TCT GGT GGC CGT CTT TTC ACC AAG GTT CCT TCA TAC GGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC - 3'
TOR1SnaBI-5'	5'- AGA ATG AAA ATA AAA AAT CCT AAA ACG GTA AAC AGT AGT ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA - 3'
Tor1Trafo3gek	5'- CCA GAC GCA GCC AAA TGA CC - 3'
Tor1Trafo5 gek	5'- GGG GAT GAG AAA GCT CAG TC - 3'
TOR2-3Asp718i	5'- GCG <u>GGG TAC</u> CTA TAT ACA GCT TAA ATT AGC - 3'
TOR2-3HA-3'	5'- TTT CTT CAT TCC TGC TTT TCA ACC CAG GAA ATT CTT TCA TGC ACT GAG CAG CGT AAT CTG G - 3'
TOR2-3HA-5'	5'- TGT TTA ATT GAG AGA ATG ATG CTA ATT TAA GCT GTA TAT AAT GTT AAT TAA CAT CTT TTA CCC - 3'
TOR2-3internEcoRI	5'- GCG <u>GGA ATT</u> CGA GGT CAT ACG CAT AGT TTG - 3'
TOR2-3Sall	5'- CGC <u>CGT CGA</u> CCA ATA TAA AGA GAT GCA TTC - 3'
TOR2-5 Sall	5'- CGC <u>CGT CGA</u> CCT ACA CCT TCA TTT TGA CCC C - 3'
TOR2-5HindIII	5'- GGC <u>GAA GCT</u> TGA GCT TTG AGA AAA ATG TAA AG - 3'
TOR2-5nach ATGAsp718I	5'- GCG <u>GGG TAC</u> CAT GAA AGA ATT TCC TGG GTT G - 3'
TOR2-5überprüf	5'- GCT TTA ACT CAT GTA ACA G - 3'
TOR2BseRI-3	5'- CTG TAC TTT TGC ACC TAA TTC TTA GTA TAC GCA GAG <u>AGG</u> AGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC - 3'
TOR2BseRI-5'	5'- CGT CAT AAA AAT ATT ACT TTT TCA ATC GTG TTT CTA TTG ATC GGA TCC CCG GGT TAA TTA A - 3'
TOR2seq	5'- GGT GCT TGT TTG GTC ACC - 3'
U-47	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3'
WAT1-5neu	5'- GTA ATG ATG GAA ACT CAT G - 3'

4.1.5 Plasmide

Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 zeigen die Plasmide, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet bzw. konstruiert wurden.

Tabelle 4.3: Verwendete Plasmide.

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion	Quelle
pAD33	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>ste20⁺</i> in YCplac33 (Reparatur von pGC1-1hin)	A. Dierkes
pALO28	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	Von dem Vektor pFA6a-13myc-kanMX6 wurde mit den Oligos SIN1-F2 und SIN1-R1 ein <i>SIN1-13myc-KanMX6</i> -PCR-Produkt synthetisiert und in das <i>BsaAI</i> -linearisierte Plasmid pALO23, ein YCplac33-Derivat, das ein 721bp großes <i>XbaI/BamHI-SIN1</i> -Fragment enthält, <i>in vivo</i> rekombiniert.	A. Lorberg
pALO33	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	Von dem Vektor pFA6a-GFP-kanMX6 wurde mit den Oligos SIN1-F2 und SIN1-R1 ein <i>SIN1-GFP-KanMX6</i> -PCR-Produkt synthetisiert und in das <i>BsaAI</i> -linearisierte Plasmid pALO23, ein YCplac33-Derivat, das ein 721bp großes <i>XbaI/BamHI-SIN1</i> -Fragment enthält, <i>in vivo</i> rekombiniert.	A. Lorberg
pALO34	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	Von dem Vektor pFA6a-TAP-kanMX6 wurde mit den Oligos SIN1-F2 und SIN1-R1 ein <i>SIN1-TAP-KanMX6</i> -PCR-Produkt synthetisiert und in das <i>BsaAI</i> -linearisierte Plasmid pALO23, ein YCplac33-Derivat, das ein 721bp großes <i>XbaI/BamHI-SIN1</i> -Fragment enthält, <i>in vivo</i> rekombiniert.	A. Lorberg
pALO35	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	Von dem Vektor pFA6a-3HA-kanMX6 wurde mit den Oligos SIN1-F2 und SIN1-R1 ein <i>SIN1-3HA-KanMX6</i> -PCR-Produkt synthetisiert und in das <i>BsaAI</i> -linearisierte Plasmid pALO23, ein YCplac33-Derivat, das ein 721bp großes <i>XbaI/BamHI-SIN1</i> -Fragment enthält, <i>in vivo</i> rekombiniert.	A. Lorberg

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion	Quelle
pALO43	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	Ein mit den Oligos SpTOR1-5BamHI und SpTor1-3BamHI synthetisiertes PCR-Fragment, das das <i>tor1⁺</i> -Gen enthält wurde mit <i>Bam</i> HI geschnitten und in den <i>Bam</i> HI geschnittenen Vektor pUR19 kloniert.	A. Lorberg
pALO59 (TAP- KanMX6)	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i>	Von dem Vektor pBS1479 wurde mit den Oligos ONK132 und ONK133 ein TAP-Fragment synthetisiert, mit <i>Pac</i> I/ <i>Asc</i> I-geschnitten und in einen <i>Pac</i> I/ <i>Asc</i> I-geschnittenen pFA6a-GFPS65T-kanMX6 kloniert.	A. Lorberg
pAN46	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Der <i>Xba</i> I/ <i>Asp</i> 718I geschnittene YCplac111 enthält ein 5961 bp-großes <i>Xba</i> I/ <i>Asp</i> 718I-geschnittenes Fragment, das das <i>KOG1</i> -Gen enthält.	A. Lorberg
pCL1	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i>	<i>GAL4</i> in YCplac50-Derivat	Clontech
pCR2.1-hph	<i>Amp^R</i> <i>HphMX</i>	Enthält das Hygromycin-Resistenz-Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und TEF-Terminators	Sato <i>et al.</i> , 2005
pCR2.1-nat	<i>Amp^R</i> <i>NatMX6</i>	Enthält das Noursethricin-Resistenz-Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und TEF-Terminators	Sato <i>et al.</i> , 2005
pFA6a- kanMX6	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i>	Enthält das Kanamycin-Resistenz-Gen	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a- kanMX6- P3nmt1	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i>	Enthält das Kanamycin-Resistenz-Gen und eine P3nmt1-Promoter-Sequenz	Bähler <i>et al.</i> , 1998
pFA6a- kanMX6- P3nmt1-3HA	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i>	Enthält eine P3nmt1-Promoter-Sequenz und das Kanamycin-Resistenz-Gen, unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und des TEF-Terminators. Kodiert für eine 3HA-Fusion, terminiert vom <i>ADH1</i> -Terminator.	Bähler <i>et al.</i> , 1998
pFA6a- GFP(S65T)- kanMX6	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i>	Enthält das Kanamycin-Resistenz-Gen, unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und des TEF-Terminators. Kodiert für eine GFP-Fusion, terminiert vom <i>ADH1</i> -Terminator.	Longtine <i>et al.</i> , 1998

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion	Quelle
pFA6a-3HA-kanMX6	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i>	Enthält das Kanamycin-Resistenz-Gen, unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und des TEF-Terminators. Kodiert für eine 3HA-Fusion, terminiert vom <i>ADHI</i> -Terminator.	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-13Myc-kanMX6	<i>Amp^R</i> <i>KanMX6</i>	Enthält das Kanamycin-Resistenz-Gen, unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und des TEF-Terminators. Kodiert für eine HA-Fusion, terminiert vom <i>ADHI</i> -Terminator.	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pGADT7	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>2μ</i>	Kodiert für die Aktivierungsdomäne von GAL4 ₍₇₆₈₋₈₈₁₎ und für eine HA-Fusion	Clontech
pGADT7-T	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>2μ</i>	Kodiert für das SV40 große T-Antigen ₍₈₄₋₇₀₈₎ in pGADT7	Clontech
pGBKT7	<i>Kan^R</i> <i>TRP1</i> <i>2μ</i>	Kodiert für die DNA-Bindedomäne von GAL4 ₍₁₋₁₄₇₎ und für eine myc-Fusion	Clontech
pTB1	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	pAD33 mit <i>P3nmt1-3HA</i> -Promotor Kasette	Clontech
pTB2	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	pTB1 mit kodierender Sequenz für die HR1-Domäne von <i>ste20⁺</i>	T. Baumgart
pTB3	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	pUR18 mit <i>P3nmt1-ste20⁺</i> (aus pTB1)	T. Baumgart
pUC19	<i>Amp^R</i>	<i>E. coli</i> Plasmid	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC21	<i>Amp^R</i>	<i>E. coli</i> Plasmid	Viera und Messing, 1991
pUK21	<i>Kan^R</i>	<i>E. coli</i> Plasmid	Viera und Messing, 1991
pUR18	<i>Amp^R</i> <i>ura4⁺</i> <i>ARS1</i>	<i>E. coli</i> / <i>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</i> / <i>S. pombe</i> "Shuttle"-Vektor	Barbet <i>et al.</i> , 1992
YCplac33	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> "Shuttle"-Vektor	Gietz und Sugino, 1988

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion	Quelle
YCplac111	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> "Shuttle"-Vektor	Gietz und Sugino, 1988
YEplac112	<i>Amp^R</i> <i>TRP1</i> <i>2μ</i>	<i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> "Shuttle"-Vektor	Gietz und Sugino, 1988

Tabelle 4.4: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide.

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion
pGC1 (hin)	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden SpSte20-5BamHI und SpSte20-3BamHI synthetisiertes PCR-Fragment, das das <i>ste20⁺</i> -Gen enthält, wurde mit <i>BamHI</i> geschnitten und in den <i>BamHI</i> geschnittenen Vektor YCplac33 kloniert.
pGC2	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden SpMip1-5SalI und SpMip1-3SalI synthetisiertes PCR-Fragment, das das <i>mip1⁺</i> -Gen enthält, wurde mit <i>SalI</i> geschnitten und in den <i>SalI</i> geschnittenen Vektor YCplac33 kloniert.
pGC3	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden forward Mip1/Kog1 und reverse Mip1/Kog1 synthetisiertes PCR-Fragment, das das <i>mip1⁺</i> -Gen enthält wurde in das mit <i>BamHI</i> linearisierte Plasmid pAN46 <i>in vivo</i> rekombiniert.
pGC4	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>KanMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Ste20-F1 und Ste20-R1 synthetisiertes PCR-Fragment wurde in das mit <i>XhoI</i> linearisierte Plasmid pGC1 <i>in vivo</i> rekombiniert, so dass das <i>ste20⁺</i> -Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde.
pGC5	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor2-5 HindIII und Tor2-3 Asp718 synthetisiertes PCR-Fragment, das die Promotorregion des <i>tor2⁺</i> -Gens enthält, wurde mit <i>HindIII</i> und <i>Asp718I</i> geschnitten und in den <i>HindIII</i> und <i>Asp718I</i> geschnittenen Vektor YCplac111 kloniert.
pGC6	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor2-5nachATGAsp718I und ü Tor2-3internEcoRI synthetisiertes PCR-Fragment, das die 5'-kodierende Region des <i>tor2⁺</i> -Gens enthält, wurde mit <i>EcoRI</i> und <i>Asp718I</i> geschnitten und in den <i>EcoRI</i> - und <i>Asp718I</i> geschnittenen Vektor pGC5 kloniert.

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion
pGC7	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor2-3HA-5' und Tor2-3HA-3' synthetisiertes PCR-Fragment, welches die DNA-Sequenz für eine 3HA-Fusion enthält, wurde in das mit <i>Asp718I</i> linearisierte Plasmid pGC6 <i>in vivo</i> rekombiniert.
pGC8	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>KanMX</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor2-BseRI-5' und Tor2-BseRI-3' synthetisiertes PCR-Fragment, welches die DNA-Sequenz für eine Kanamycin-Resistenzkassette enthält, wurde in das mit <i>BseRI</i> linearisierte Plasmid pGC7 <i>in vivo</i> rekombiniert.
pGC9	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor1-5 HindIII und Tor1-3vorATGBamHI synthetisiertes PCR-Fragment, das die Promotorregion des <i>tor1⁺</i> -Gens enthält, wurde mit <i>HindIII</i> und <i>BamHI</i> geschnitten und in den <i>HindIII</i> und <i>BamHI</i> geschnittenen Vektor YCplac111 kloniert.
pGC10	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor1-ATGBamHI und Tor1internSacI-3 synthetisiertes PCR-Fragment, das die 5'-kodierende Region des <i>tor1⁺</i> -Gens enthält, wurde mit <i>SacI</i> und <i>BamHI</i> geschnitten und in den <i>SacI</i> und <i>BamHI</i> geschnittenen Vektor pGC9 kloniert.
pGC11	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor1-3HA-5' und Tor1-3HA-3' synthetisiertes PCR-Fragment, welches die DNA-Sequenz für eine 3HA-Fusion enthält, wurde in das mit <i>BamHI</i> linearisierte Plasmid pGC10 <i>in vivo</i> rekombiniert.
pGC12	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Tor1-SnaBI-5' und Tor1-SnaBI-3' synthetisiertes PCR-Fragment, welches die DNA-Sequenz für eine Kanamycin-Resistenzkassette enthält, wurde in das linearisierte Plasmid pGC11 <i>in vivo</i> rekombiniert.
pGC13	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Lst8/Wat1 forward und Lst8/Wat1 reverse synthetisiertes PCR-Fragment, welches die DNA-Sequenz für <i>wat1⁺</i> enthält, wurde in das mit <i>SnaBI</i> linearisierte Plasmid YCplac111:: <i>LST8</i> <i>in vivo</i> rekombiniert.
pGC15	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Avo1SphI und 3'Avo1Asp718I synthetisiertes PCR-Fragment, das das <i>AVO1</i> -Gen enthält, wurde mit <i>SphI</i> und <i>Asp718I</i> geschnitten und in den <i>Asp718I</i> und <i>SphI</i> geschnittenen Vektor YCplac111 kloniert.
pGC16	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden 5'Avo1/Sin1 und 3'Avo1/Sin1 synthetisiertes PCR-Fragment, welches die DNA-Sequenz für <i>sin1⁺</i> enthält, wurde in das mit <i>BamHI</i> linearisierte Plasmid pGC15 <i>in vivo</i> rekombiniert.

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion
pGC17	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden 5' Avo3 SalI und 3' Avo3 SacI synthetisiertes PCR-Fragment, das das <i>AVO3</i> -Gen enthält, wurde mit <i>SalI</i> und <i>SacI</i> geschnitten und in den <i>SalI</i> und <i>SacI</i> geschnittenen Vektor YCplac111 kloniert.
pGC18	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden 5' Avo3/Ste20 und 3' Avo3/Ste20 synthetisiertes PCR-Fragment, welches die DNA-Sequenz für <i>ste20⁺</i> enthält, wurde in das mit <i>BamHI</i> linearisierte Plasmid pGC17 <i>in vivo</i> rekombiniert.
pGC19	<i>Amp^R</i> <i>TRP1</i> <i>2μ</i>	Das Plasmid pGC3 wurde mit <i>NsiI</i> und <i>SacI</i> geschnitten. Das resultierende Fragment, welches das <i>mip1⁺</i> -Gen enthält, wurde in den mit <i>NsiI</i> und <i>SacI</i> geschnittenen Vektor YEplac 112 kloniert.
pGC20	<i>Amp^R</i> <i>TRP1</i> <i>2μ</i>	Das Plasmid pGC16 wurde mit <i>SphI</i> und <i>SacI</i> geschnitten. Das resultierende Fragment, welches das <i>sin1⁺</i> -Gen enthält, wurde in den mit <i>SphI</i> und <i>SacI</i> geschnittenen Vektor YEplac 112 kloniert.
pGC21	<i>Amp^R</i> <i>TRP1</i> <i>2μ</i>	Das Plasmid pGC18 wurde mit <i>SalI</i> und <i>EcoRI</i> geschnitten. Das resultierende Fragment, welches das <i>ste20⁺</i> -Gen enthält, wurde in den mit <i>SalI</i> und <i>EcoRI</i> geschnittenen Vektor YEplac 112 kloniert.
pGC22	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>2μ</i>	Ein mit den Oligonukleotiden AVO3 HR1EcoRI-THS-5' und AVO3HR1BamHI-THS-3 synthetisiertes PCR-Fragment, welches ein Fragment des <i>AVO3</i> -Gens ₍₂₁₋₅₅₀₎ enthält, wurde mit <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> geschnitten und in den <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> geschnittenen Vektor pGADT7 kloniert.
pGC23	<i>Kan^R</i> <i>TRP1</i> <i>2μ</i>	Ein mit den Oligonukleotiden ScCLC1EcoRI-THS-5' und ScCLC1BamHI-THS-3 synthetisiertes PCR-Fragment, welches das <i>CLC1</i> -Gen aus <i>S. cerevisiae</i> enthält, wurde mit <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> geschnitten und in den <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> geschnittenen Vektor pGBKT7 kloniert.
pGC24	<i>Amp^R</i>	Das Plasmid pGC1 wurde mit <i>Asp718I</i> und <i>XbaI</i> geschnitten. Das resultierende 1444bp-Fragment, welches ein Fragment des <i>ste20⁺</i> -Gens enthält, wurde mit dem, ebenfalls über eine <i>Asp718I</i> - und <i>XbaI</i> -Restriktion von dem Plasmid pUC19, erhaltenen 2671-Fragment kloniert.
pGC25	<i>Kan^R</i> <i>TRP1</i> <i>2μ</i>	Das Plasmid pGC22 wurde mit <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> geschnitten. Das resultierende Restriktionsprodukt, welches ein Fragment des <i>AVO3</i> -Gens ₍₂₁₋₅₅₀₎ enthält, wurde mit dem, ebenfalls mit <i>BamHI</i> und <i>EcoRI</i> geschnittenen, Vektor pGBKT7 kloniert.

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion
pGC26	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>2μ</i>	Das Plasmid pGC23 wurde mit <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI geschnitten. Das resultierende Restriktionsprodukt, welches das <i>CLC1</i> -Gen enthält, wurde mit dem, ebenfalls mit <i>Bam</i> HI und <i>Eco</i> RI geschnittenen, Vektor pGADT7 kloniert.
pGC27	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden Gad8-5 <i>Bam</i> HIneu und Gad8-3 <i>Bam</i> HIneu synthetisiertes PCR-Fragment, das das <i>gad8⁺</i> -Gen enthält, wurde mit <i>Bam</i> HI geschnitten und in den <i>Bam</i> HI geschnittenen Vektor YCplac33 kloniert.
pGC28	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>HphMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden GAD8-F1 und GAD8-R1 synthetisiertes PCR-Fragment wurde in das mit <i>Mun</i> I linearisierte Plasmid pGC27 <i>in vivo</i> rekombiniert, so dass das <i>gad8⁺</i> -Gen durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde.
pGC29	<i>Amp^R</i> <i>URA3</i> <i>KanMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden GAD8-F1 und GAD8-R1 synthetisiertes PCR-Fragment wurde in das mit <i>Mun</i> I linearisierte Plasmid pGC27 <i>in vivo</i> rekombiniert, so dass das <i>gad8⁺</i> -Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde.
pGC33	<i>Amp^R</i> <i>LEU2</i> <i>KanMX6</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit den Oligonukleotiden tor1+-nmt1prom-5' und tor1+-nmt1prom-3HA-3' synthetisiertes PCR-Fragment wurde in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid pGC10 <i>in vivo</i> rekombiniert, so dass ein <i>P3nmt1</i> -Promotor vor dem <i>tor1⁺</i> -Gen vorhanden war.

4.2 Stämme und Medien

4.2.1 Bakterien-Stämme und -Medien

4.2.1.1 *E. coli* Stamm

In dieser Arbeit wurde der DH5α-Stamm für *E. coli*-Transformationen verwendet (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Verwendeter *E. coli* Stamm.

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5α	F-φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe

4.2.1.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*

Zur Anzucht von *E. coli* Zellen wurde Vollmedium (LB) verwendet.

LB

0,5 % Hefeextrakt; 0,5 % NaCl; 1 % Trypton

Um feste Nährböden herzustellen, wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 2 % Agar zugegeben. Eine Selektion erfolgte durch Zugabe von 80 µg/ml Ampicillin bzw. 25 µg/ml Kanamycin nach dem Autoklavieren.

4.2.1.3 Lagerung von *E. coli* Stämmen

E. coli-Zellen wurden in Form von Glycerinkulturen aufbewahrt. Dabei wurden zu 500µl Übernachtkultur jeweils 500 µl sterile 50 %ige Glycerin-Lösung gegeben und bei -80°C gelagert. Auf Selektionsplatten wurden die Stämme nur für kurze Zeit bei 4°C aufbewahrt.

4.2.2 Hefestämme

4.2.2.1 *S. cerevisiae* Stämme

In Tabelle 4.6 sind die *S. cerevisiae*-Stämme dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 4.6: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
AH109	<i>MATa trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, Δgal4 Δgal80 LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
AN24-6C	TB50 <i>MATa Δkog1::KanMX6 + pAN45 (YCplac33::KOG1)</i>	A. Lorberg
AN160-1A	TB50 <i>MATa Δlst8::KanMX6 + pRS416::LST8</i>	A. Lorberg
RL23-1C	TB50 <i>KanMX6-Gal1_{prom}-AVO1</i>	Loewith <i>et al.</i> , 2002
RL57-2D	TB50 <i>KanMX6-Gal1_{prom}-LST8</i>	Loewith <i>et al.</i> , 2002
RL93a	TB50 <i>MATa KanMX6-Gal1_{prom}-KOG1 leu2 ura3 rme1 trp1 Δhis3 GAL+ HMLa</i>	M. Hall

Stamm	Genotyp	Quelle
SW53-1B	TB50 <i>MATα HIS3MX-Gal1_{prom}-AVO3</i>	M. Hall
TB50a	<i>MATα leu2-3, 112 ura3-52 rme1 trp1 Δhis3 GAL+ HMLα</i>	Loewith <i>et al.</i> , 2002
RL54-1B	TB50 <i>Mata KOG1-3HA-KanMX6 leu2-3, 112 ura3-52 rme1 trp1 Δhis3 GAL+ HMLα</i>	M. Hall

4.2.2.2 Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae* Stämmen

S. cerevisiae-Zellen wurden in Voll (YEP)- oder Minimalmedium (YNB) angezogen.

YEP

1 % Hefeextrakt; 2 % Pepton

YNB

0,67 % Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids; 0,02 % Adenin-Hemisulfat; 0,02 % Arginin; 0,02 % L-Histidin; 0,03 % L-Isoleucin Monohydrochlorid Monohydrat ; 0,1 % L-Leucin; 0,03 % L-Lysin Monohydrochlorid; 0,02 % L-Methionin; 0,05 % L-Phenylalanin; 0,03 % L-Threonin; 0,04 % L-Tryptophan; 0,03 % L-Tyrosin; 0,15 % L-Valin

Für feste Nährböden wurde dem Medium 2 % Agar vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurde 2 % Glukose/Galaktose/Raffinose aus einer 20 %igen Stammlösung zugegeben. Eine Selektion erfolgte gegebenenfalls durch die Auswahl bestimmter Aminosäuren/Basen im Medium.

4.2.2.3 Lagerung von *S. cerevisiae* Stämmen

Die Stämme wurden für 6 – 8 Wochen bei 4°C auf Nährböden gelagert. Des Weiteren wurden von den Stämmen Glycerinkulturen (500 μ l Kultur + 500 μ l 50 % ige sterile Glycerin-Lösung) bei -80°C eingefroren.

4.2.2.4 *S. pombe* Stämme

Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8 zeigen die hier verwendeten bzw. konstruierten *S. pombe* Stämme.

Tabelle 4.7: Verwendete *S. pombe* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
Sp34	972 <i>h</i> ⁻	Leupold, 1970
Sp38	972 <i>h</i> ⁺	Leupold, 1970
SPAD 11-2B	972 <i>h</i> ⁻ <i>fkh1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	A. Dierkes
SPAD13-2C	972 <i>h</i> ⁻ <i>fkh1</i> ⁺ -3HA-KanMX6	A. Dierkes
SPAD14-2C	972 <i>h</i> ⁻ <i>fkh1</i> ⁺ -13myc-KanMX6;	A. Dierkes
SPAD22-T.3	972 <i>h</i> ⁻ Δ <i>tsc1</i> ::NatMX6	A. Dierkes
SPAD91-T16	972 <i>h</i> ⁻ Δ <i>ste20</i> ::NatMX6	A. Dierkes
SPAD93-T1A	972 <i>h</i> ⁻ Δ <i>tor1</i> ::KanMX6	A. Dierkes
SPAD97-1A	972 <i>h</i> ⁻ Δ <i>sin1</i> ::KanMX6 <i>leu2-31</i>	A. Dierkes
SPAD97-T3	972 <i>h</i> ⁻ Δ <i>wat1</i> ::KanMX6	A. Dierkes
SPAD99-T2	972 <i>h</i> ⁻ Δ <i>HRI-ste20-3HA-KanMX6</i>	A. Dierkes
SPAD99-T3	972 <i>h</i> ⁻ Δ <i>HRI-ste20-3HA-KanMX6</i>	A. Dierkes
SPAL1-8	972 <i>h</i> ⁻ <i>mip1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	A. Lorberg
SPAL1-10	972 <i>h</i> ⁻ <i>mip1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	A. Lorberg
SPAL3-1	972 <i>h</i> ⁻ <i>wat1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	A. Lorberg
SPAL3-4	972 <i>h</i> ⁻ <i>wat1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	A. Lorberg
SPAL4-9	972 <i>h</i> ⁻ <i>wat1</i> ⁺ -3HA-KanMX6	A. Lorberg
SPAL4-11	972 <i>h</i> ⁻ <i>wat1</i> ⁺ -3HAKanMX6	A. Lorberg
SPAL23-15	972 <i>h</i> ⁻ <i>wat1</i> ⁺ -GFP-KanMX6	A. Lorberg
SPAL41	972 <i>h</i> ⁻ <i>gad8</i> ⁺ -13myc-KanMX6	A. Lorberg
SPAL42-3	972 <i>h</i> ⁻ <i>gad8</i> ⁺ -TAP-KanMX6	A. Lorberg
SPAL42-4	972 <i>h</i> ⁻ <i>gad8</i> ⁺ -TAP-KanMX6	A. Lorberg
SPKS61-6A	<i>h</i> ⁺ KanMX6: <i>nmt1:HA-tor2</i>	K. Schaubitzer
SPKS68-2B	BA121 <i>h</i> ⁺ <i>tor2-51:ura4</i> ⁺	K. Schaubitzer

Tabelle 4.8: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *S. pombe* Stämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
SPGC1	972 <i>h</i> ⁻ <i>ste20</i> ⁺ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPGC2-3A	972 <i>h</i> ⁻ <i>mip1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC3	972 <i>h</i> ⁻ <i>mip1</i> ⁺ -13myc-KanMX6	diese Arbeit
SPGC4	972 <i>h</i> ⁻ <i>ste20</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC5-4C	972 <i>h</i> ⁻ <i>ste20</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC7-1C	972 <i>h</i> ⁺ <i>wat1</i> ⁺ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPGC8-3A	972 <i>h</i> ⁺ <i>ste20</i> ⁺ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPGC9-2C	972 <i>h</i> ⁻ <i>wat1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC10-1B	972 <i>h</i> ⁺ <i>mip1</i> ⁺ -13myc-KanMX6 <i>wat1</i> ⁺ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPGC11-1B	972 <i>h</i> ⁺ <i>ste20</i> ⁺ -3HA-KanMX6 <i>wat1</i> ⁺ -TAP-KanMX6	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
SPGC12-2	972 h^+ $sin1^+$ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPGC12-4	972 h^+ $sin1^+$ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPGC14-3	972 h^- $sin1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC14-4	972 h^- $sin1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC15-2B	972 h^+ $sin1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC16-2B	972 h^+ $sin1^+$ -TAP-KanMX6 $wat1^+$ -3HA-KanMX6	diese Arbeit
SPGC17-5	972 h^- KanMX6-3HA- $tor2^+$ T.5	diese Arbeit
SPGC17-7	972 h^- KanMX6-3HA- $tor2^+$ T.7	diese Arbeit
SPGC18-1B	972 h^+ KanMX6-3HA- $tor2^+$	diese Arbeit
SpGC20-2B	972 h^- $mip1^+$ -13myc-KanMX6	diese Arbeit
SpGC21-1B	972 h^+ $wat1^+$ -GFPKanMX6	diese Arbeit
SpGC22-3C	972 h^- KanMX6-3HA- $tor2^+$ $ste20^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SpGC23-4C	972 h^- KanMX6-3HA- $tor2^+$ $wat1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SpGC24-1C	972 h^- KanMX6-3HA- $tor2^+$ $sin1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC26-5B	972 h^- KanMX6-3HA- $tor2^+$ $mip1^+$ -TAP-KanMX	diese Arbeit
SPGC27-6A	972 h^- $mip1^+$ -13myc-KanMX6 $sin1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC28-4D	972 h^- $ste20^+$ -3HA-KanMX6 $mip1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC29-3	972 h^- KanMX6-3HA- $tor1^+$	diese Arbeit
SPGC29-8	972 h^- KanMX6-3HA- $tor1^+$	diese Arbeit
SPGC30-1A	972 h^+ $sin1^+$ -3HA-KanMX6 $ste20^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC31-7A	972 h^+ KanMX6-3HA- $tor1^+$ $mip1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC32-3D	972 h^- KanMX6-3HA- $tor1^+$ $ste20^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC33-1B	972 h^+ KanMX6-3HA- $tor1^+$ $sin1^+$ -TAP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC34-1B	972 h^+ KanMX6-3HA- $tor1^+$	diese Arbeit
SPGC36-2D	972 h^- KanMX6-3HA- $tor1^+$ $wat1^+$ -GFP-KanMX6	diese Arbeit
SPGC37-1D	972 h^- $fkh1^+$ -13myc-KanMX6 KanMX-3HA- $tor2^+$	diese Arbeit
SPGC39-1D	972 h^- $fkh1^+$ -TAP-KanMX6 KanMX6-3HA- $tor1^+$	diese Arbeit
SPGC41	972 h^- Δ gad8::hphMX6	diese Arbeit
SPGC47-1	972 h^- KanMX6-P3nmt1-3HA- $tor1^+$	diese Arbeit
SPGC52-1A	972 h^- KanMX6-P3nmt1-3HA- $tor1^+$	diese Arbeit

4.2.2.5 Medien zur Anzucht von *S. pombe*-Zellen

Die *S. pombe*-Zellen wurden sowohl in Voll (YE5SD; YED)- als auch in Minimalmedium (EMMD) angezogen. Zur Paarung zweier Hefestämme wurde Malzmedium verwendet.

YED

0,5 % Hefeextrakt; 3 % Glukose

YE5SD

0,5 % Hefeextrakt; 10 % 10x Aminosäure- und Basenmix (0,15 % Adenin-Hemisulfat, 0,075 % L-Histidin, 0,075 % L-Leucin, 0,075 % Uracil, 0,075% L-Lysin), 3 % Glukose

EMMD

15 mM Kaliumphthalat; 15 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 170 mM Ammoniumchlorid oder 6,8 mM Glutaminsäure; 2 % 50 x Salzstocklösung (260 mM $\text{MgCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 4,99 mM $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,67 M KCl, 14,1 M Na_2SO_4); 0,1 % 1000 x Vitaminstocklösung (4,2 mM Natriumpantothensäure, 81,2 mM Nikotinsäure, 55,5 mM myo-Inositol, 40,9 μM d-Biotin); 0,01 % 10000 x Mineralienstocklösung (80,9 mM Borsäure, (80,9 mM Borsäure, 20,2 mM $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 13,9 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 7,4 mM $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,32 % MoO_3 , 6 mM KI, 16 mM $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 47,6 mM Zitronensäure-Monohydrat); 2 % Glukose

Malzmedium

3 % Malzextrakt; 10 % 10x Aminosäure- und Basenmix (0,15 % Adenin-Hemisulfat, 0,075 % L-Histidin, 0,075 % L-Leucin, 0,075 % Uracil, 0,075 % L-Lysin)

Für Nährböden wurde dem Medium 2 % Agar vor dem Autoklavieren zugefügt. Die Glukosezugabe erfolgte nach dem Autoklaviervorgang aus einer 20 %- bzw. 30 %igen Stammlösung. Zur Selektion wurden dem autoklavierten Medium gegebenenfalls steril filtrierte G418-Sulfat (100 $\mu\text{g/ml}$ -), Hygromycin (300 $\mu\text{g/ml}$ -) oder Clonat (Nourseothricin) (100 $\mu\text{g/ml}$ -) Lösungen beigelegt. Für phänotypische Analysen wurden dem Medium die, in Tabelle 4.9 aufgeführten, Substanzen zugegeben.

Tabelle 4. 9: Liste der in phänotypischen Analysen getesteten Substanzen.

Chemikalien	Endkonzentration im Medium	Konzentration der Stammlösung
Amilorid	20 – 40 μ M	10 mg/ml gelöst in H ₂ O
CaCl ₂	0,1 M	1 M gelöst in H ₂ O
Canavanin	5-70 μ g/ml	10 mg/ml gelöst in H ₂ O
Ethionin	30 μ g/ml	10 mg/ml gelöst in H ₂ O
H ₂ O ₂	1 mM	8,82 M gelöst in H ₂ O
KCl	0,5-1 M	2,5 M gelöst in H ₂ O
Koffein	5-12 mM	100 mM gelöst in H ₂ O
NaCl	0,2-0,5 M	2,5 M gelöst in H ₂ O
Rapamycin	100 oder 200 ng/ml	1 mg/ml gelöst in 90 % Ethanol 10 % Tween

4.2.2.6 Lagerung von *S. pombe*-Stämmen

Die *S. pombe*-Stämme wurden alle 6 - 8 Wochen frisch auf Nährböden ausgestrichen und bei 4°C gelagert. Außerdem wurden Gefrierkulturen hergestellt. Dafür wurde eine Übernachtskultur bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert, bevor diese 1 - 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, bis sich die Zellen deutlich abgesetzt haben. Das Medium wurde daraufhin entfernt und die verbleibenden Zellen (ca. 700 μ l) mit 700 μ l „Yellow freezing Mix“ (0,5 % Hefeextrakt; 3 % Glukose; 30 % Glycerol; 0,075 % Adenin-Hemisulfat, 0,075 % L-Histidin, 0,075 % L-Leucin, 0,075 % Uracil, 0,075 % L-Lysin; 0,075 % Glutaminsäure) gemischt und bei -80°C gelagert.

4.3 Methoden

4.3.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. pombe*

Die Zellen einer Übernachtskultur von 10ml YE5S+D wurden mittels Zentrifugation geerntet (5 min, 800 x g, RT) und in 1 ml SP1 (1,2 M Sorbitol, 50 mM Natriumcitrat, 50 mM Natriumphosphat, 40 mM EDTA, 0,25 mg/ml Zymolyase-frisch hinzugefügt, pH 5,6) aufgenommen. Nach einer Inkubation von 45 min bei 37°C wurde überprüft, ob sich Spheroblasten gebildet haben. War dies der Fall, wurden die Spheroblasten pelletiert (5 min, 800 x g, RT) und in 450 µl 5 x TE (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA pH 8) aufgenommen. Vor einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde SDS (Endkonzentration 1 %) hinzugefügt. Die Proben wurden nach einer Zugabe von 150 µl 5 M Kaliumacetat 10 min auf Eis gestellt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 18000 x g, 4°C) wurde das Pellet verworfen und der Überstand 1:1 mit Isopropanol gemischt. Auf eine weitere Zentrifugation (3 min, 18000 x g, 4°C) und dem Verwerfen des Überstandes folgte die Aufnahme des DNA-Pellets in 250 µl 5 x TE und 2 µl RNase (10 mg/ml). Um die DNA vollständig zu resuspendieren wurden die Proben für mindestens 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl 10 % SDS und 2 µl Proteinase K (5 mg/ml) folgte eine 1 stündige Inkubation bei 55°C. Zu den Proben wurde dann 250 µl Phenol gegeben und nach Zentrifugation (3 min, 2700 x g, 4°C) die obere, wäßrige Phase abgenommen. Dieser Vorgang wurde wiederholt und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe eines äquivalenten Volumens Chloroform und Zentrifugation wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und die DNA mit 25 µl 3 M NaAC und 675 µl Ethanol (20 min, 17900 x g, 4°C) gefällt. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 30 µl 1xTE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen.

4.3.2 Amplifikation von DNA

Die DNA-Amplifikation wurde mittels der „Polymerase chain reaction“ (PCR) in einem Thermocycler (Biometra T3000) durchgeführt. Als „Template“ dienten chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder ganze Zellen, welche von einem, maximal 3 Tage alten, Ausstrich stammten. Ganze Zellen wurden in 20 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden folgendermaßen hergestellt:

1) Amplifikation von DNA

1-2 µl Plasmid-DNA (1:50 - 100 verdünnt), chromosomale DNA oder Zellsuspension

3 µl 5' Oligonukleotid (10 pmol/µl)

3 µl 3' Oligonukleotid (10 pmol/µl)

10 µl Reaktionspuffer 2 („High Expand Fidelity Buffer 2 with MgCl₂“, Roche)

4 µl MgCl₂ (25 mM)

1 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)

0,5 µl „High Expand Fidelity“ Polymerase (Roche)

77-78 µl steriles H₂O

2) Analytische PCR

1 µl Zellsuspension

1,5 µl 5' Oligonukleotid (10 pmol/µl)

1,5 µl 3' Oligonukleotid (10 pmol/µl)

5 µl Reaktionspuffer 2 („High Expand Fidelity Buffer 2 with MgCl₂“, Roche)

2 µl MgCl₂ (25 mM)

0,5 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 10 mM)

0,5 µl „Taq“-Polymerase (Roche)

35,5 µl steriles H₂O

Das PCR-Programm setzte sich aus verschiedenen Schritten zusammen. Nachdem die DNA-Doppelstränge denaturiert wurden (5 min, 96°C), erfolgte die Zugabe der jeweiligen DNA-Polymerase („Hot Start“). Danach wurden jeweils 35 Zyklen durchlaufen, wobei sich jeder Zyklus aus 45 sek 96°C, 2 min 56- 63°C (je nach optimaler Anlagerung der Primer) und mindestens 2 min 68°C bzw. 72°C (DNA-Synthese, Zeit und Temperatur abhängig von der Größe des zu erwartenden PCR-Produkts) zusammensetzte. Nach Abschluss des 35. Zyklus folgten weitere 10 min bei 68°C bzw. 72°C (Elongation der nicht vollständig synthetisierten DNA-Fragmente), bevor die PCR-Produkte auf 4°C gekühlt wurden.

4.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden 0,8 - 2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM NaAc, 2 mM EDTA, pH 8) aufgekocht. Vor dem Lauf wurden zu den Proben 6 x DNA-Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % Glycerin) gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und konstanter Spannung von 75 V bzw. 120 V (Amersham, EPS 301). Als Größenstandard diente *EcoRI* und *HindIII* geschnittene λ -DNA. Die im Agarose-Gel enthaltene DNA wurde 10 - 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (4 μ g/ml, Roth) gefärbt und anschließend mit Hilfe von einem UV-Transilluminator (304 nm; CN 1000-Darkroom; Bio-Capt Software) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurde eine Videoprintanlage von Mitsubishi (P93) verwendet.

4.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die im Agarosegel aufgetrennte DNA wurde mit Hilfe eines UV-Tisches (Biometra T1) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Dieser Vorgang wurde anschließend mit dem UV-Transilluminator (CN 1000-Darkroom; Bio-Capt Software) überprüft. Die DNA wurde aus den Agarosestücken gemäß Herstellerangaben der verwendeten „Kits“ isoliert. Dabei kamen das „Agarose Gel DNA Extraction Kit“ (Roche), das „DNA Extraction Kit“ (#K0513, Fermentas) oder das „E.Z.N.A. Gel extraction Kit“ (Omega biotech) zum Einsatz.

4.3.5 Reinigung von PCR-Produkten

Um anschließende enzymatische Reaktionen nicht zu beeinträchtigen, wurden die PCR-Produkte vor einer Klonierung gereinigt. Dieses erfolgte entweder mittels des „High Pure PCR Product Purification Kits“ von Roche oder nach dem Protokoll „Purification of DNA from enzymatic reactions“ der Firma Omega biotech.

4.3.6 Fällung von DNA

Um die DNA-Konzentration einer Probe zu erhöhen, wurde eine Natriumacetatfällung durchgeführt. Dazu wurden die Proben bei einem Volumen von 100 μ l nach Zugabe von 10 μ l 3 M Natriumacetat und 250 μ l 96 % Ethanol 20 min bei 17900 x g zentrifugiert. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde dieses in einem Volumen von 10-30 μ l TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8) aufgenommen und anschließend zum Lösen 15 min bei 37°C inkubiert.

4.3.7 Restriktion von DNA

Für Klonierungen wurden sowohl Plasmid-DNA als auch PCR-Produkte mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Fermentas, New England Biolabs, Roche). Sowohl die Zusammensetzung der Restriktionsansätze, als auch die Inkubationsdauer und -temperatur wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.3.8 Dephosphorylierung von Plasmiden

Um nach der Linearisierung eines Plasmides eine unerwünschte Religation zu vermeiden, wurde dieses Plasmid dephosphoryliert. Dazu folgte direkt nach der Restriktion die Behandlung des Restriktionsansatzes mit alkalischer Phosphatase gemäß Herstellerangaben (Roche).

4.3.9 Ligation

Das DNA-Fragment wurde in 5-molarem Überschuss im Vergleich zur Plasmid-DNA im Ligationansatz eingesetzt. Zur Ligation wurde die T4-Ligase der Firma Roche nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Ligation erfolgte 1-2 h bei Raumtemperatur.

4.3.10 Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Transformation von *E. coli*-Zellen wurde nach der Rubidiumchlorid-Methode nach Hanahan *et al.* (1995) durchgeführt.

4.3.11 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte modifiziert nach einem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989). Jeweils eine Kolonie der *E. coli*-Transformanten wurde über Nacht in 3 ml Selektionsmedium angezogen und bei 9.300 x g 1 min (RT) geerntet. Das Pellet wurde in 300 µl Lösung 1 (100 µg/ml RNase A, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) resuspendiert, worauf die alkalische Lyse der Zellen durch Zugabe von ebenfalls jeweils 300 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) erfolgte. Nach Neutralisation durch Lösung 3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und 15 min bei 17.900 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, während zu dem Überstand 600 µl Isopropanol gegeben wurden, der Ansatz invertiert und erneut 15 min bei 17.900 x g bei 4°C zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Pellet getrocknet. Es folgte eine 20-minütige Inkubation mit 100 µl RNase-Lösung (Lösung 1, 5 % RNase A) bei 37°C. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl 96 % Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation

(15 min, 17.900 g bei 4°C) wurde das Pellet getrocknet und anschließend in 50 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8) bzw. 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5 aufgenommen und für 2 min bei 37°C zum Lösen inkubiert. Die auf diesem Wege isolierten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

4.3.12 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde im „Ultraspec 2100 pro“-Photometer bestimmt. Eine 1:500 Verdünnung wurde in einer Quarzküvette bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm gemessen und daraus die Konzentration ermittelt.

4.3.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte mit Hilfe folgender Firmen: SRD (Scientific Research and Development, Oberursel), GATC (Konstanz) oder SeqLab (Göttingen). Eine Vorbereitung der Plasmide wurde nach den entsprechenden Angaben der jeweiligen Firma durchgeführt.

4.3.14 Transformation von kompetenten *S. cerevisiae* Zellen

Die Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte nach Dohmen *et al.* (1991), die auf einer Methode nach Klebe *et al.* (1983) basiert.

4.3.15 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae*

Die Plasmide wurden aus *S. cerevisiae* nach einer Methode von Robzyk und Kassir (1992) isoliert.

4.3.16 Transformation von *S. pombe* Zellen

Zur homologen Rekombination von DNA-Fragmenten in das Genom von *S. pombe* wurden die Zellen mit der Lithium-Acetat-Methode transformiert. Eine *S. pombe*-Kultur (100 ml Vollmedium) wurde bei einer OD_{600nm} von ca. 0,5 geerntet (5 min, 800 x g, RT). Anschließend wurde das Zellpellet gewaschen und in 1 M LiAC aufgenommen, so dass 1 x 10⁹ Zellen pro ml vorhanden sind. Aliquots von 100µl wurden eine Stunde bei 30°C inkubiert, bevor 10 µl DNA, 5 µl Hering-Sperma-DNA (Stammlösung 10 mg/ml (Roche), welche vorher 10 min aufgekocht und anschließend 5 min auf Eis abgekühlt wurde) und 290 µl 50 % PEG 4000 (w/v) hinzugefügt wurden. Die Proben wurden eine Stunde bei 30°C und danach 15 min bei 43°C inkubiert. Nachdem die Zellen 2 min bei RT abgekühlt wurden,

wurden sie pelletiert (2 min, 2.300 x g, RT) und in 1 ml ½ YE5S aufgenommen. Nach 2 h Inkubation der Zellen bei 30°C erfolgte ein Waschschrift (3 min, 2300 x g, RT). Dann wurden die Zellen in 240 µl MilliQ aufgenommen und je 60 µl Zellsuspension auf insgesamt vier Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden für mindestens 2 Tage bei RT oder 30°C inkubiert.

Falls ein Plasmid in einen *S. pombe* Stamm transformiert werden sollte, wurde die beschriebene Methode modifiziert. Statt 10 µl DNA-Fragment wurden 6 µl Plasmid-DNA zusammen mit den 5 µl Heringssperma-DNA zu einem 100 µl Aliquot Zellen gegeben. Nach der Aufnahme der Zellen in ½ YE5S erfolgte keine zwei-, sondern eine halbstündige Inkubation bei 30°C. Daraufhin wurden 100 µl des Ansatzes direkt auf eine Selektionsplatte ausplattiert, während die restliche Zellsuspension pelletiert (3 min, 2.300 x g, RT) und unter selektiven Bedingungen ausplattiert wurde. Die Agarplatten wurden mindestens 2 Tage bei 30°C bzw. RT inkubiert.

4.3.17 Das Zwei-Hybrid-System

Das Zwei-Hybrid-System ist eine molekularbiologische Methode, um mögliche Interaktionen zwischen zwei Proteinen zu bestimmen (Young *et al.*, 1998; Joung *et al.*, 2000). Dabei macht man sich zunutze, dass Hefe-TATA-Boxen und Hefe-UAS („upstream activating sequences“) ihre Funktion auch an einem anderen Lokus im Chromosom, als ihrem ursprünglichen, ausüben können. So ist bei dem hier verwendeten Zwei-Hybrid-System die UAS-Sequenz des Gal4-Transkriptionsfaktors, der ursprünglich die Galaktose-induzierte Genexpression reguliert, vor verschiedene Reportergene integriert (Giniger *et al.*, 1985; Fields und Song, 1989). Der Gal4-Transkriptionsfaktor ist in diesem System in zwei Teile, die Aktivierungsdomäne (AD) und die DNA-Bindedomäne (BD), geteilt. Mittels zweier Vektoren, pGBKT7 und pGADT7, die die kodierenden Sequenzen für diese Domänen enthalten, wurden die Untersuchungen durchgeführt. Durch die Auswahl des *S. cerevisiae*-Stammes AH109, dienten hier sowohl *HIS3*, *ADE2* als auch *MEL1* als Reportergene. Das Tropfen der, mit den Plasmiden transformierten, AH109-Stämme auf Nährmedien ohne Histidin und Adenin sollte Aufschluss über eine mögliche Interaktion der Proteine geben.

4.3.18 Tropftest

Für phänotypische Analysen wurden *S. pombe*-Zellen auf Agarplatten mit verschiedenen Substanzen getropft und bezüglich ihres Wachstumsverhaltens unter den gewählten Bedingungen untersucht. Dazu wurde aus einer Übernachtskultur auf eine OD_{600nm} von 0,15 -

0,2 angeimpft und bei 30°C inkubiert. Nach dem Erreichen von einer OD_{600nm} 0,6 - 0,8 wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Zellkulturen angefertigt. Es wurden je 10.000/ 1.000/ 100/ und 10 Zellen auf die gewählten Nährmedien getropft und für 2-5 Tage bei RT (falls mit temperatursensitiven Stämmen gearbeitet wurde), 30°C oder 37°C inkubiert.

Für Komplementationsanalysen wurden *S. cerevisiae*-Stämme auf bestimmte Nährmedien getropft und ihr Wachstumsverhalten analysiert. Bei den Agarplatten dienten Galaktose oder Glukose, bei den Flüssigkulturen Raffinose als Kohlenstoffquelle. Ansonsten wurde so verfahren, wie hier für die phänotypische Analysen beschrieben.

4.3.19 Herstellung von *S. pombe* Stämmen zur Produktion von Fusionsproteinen

Zur Herstellung von Stämmen, die Fusionsproteine produzieren, wurde nach einer Vorschrift von Bähler *et al.* (1998) vorgegangen. Als Matrize für die Amplifikation der Transformationskassette dienten dabei die Plasmide pALO59, pFA6a-*GFP(S65T)-kanMX6*, pFA6a-*3HA-kanMX6* oder pFA6a-*13Myc-kanMX6* (Tabelle 4.3). Dabei wurden die Primer „F2“ und „R1“ (Tabelle 4.2) so gewählt, dass bei einer erfolgreichen homologen Rekombination des PCR-Produktes in das *S. pombe* Genom, dem entsprechenden Gen am 3'-Ende die DNA-Sequenz kodierend für entweder eine GFP-/3HA-/13MYC- oder TAP-Fusion angehängt wurde. In manchen Fällen wurden die Transformationskassetten mit Hilfe von Plasmiden gewonnen, welche für das jeweilige Fusionsprotein und die Resistenzkassette kodierten. Durch längere homologe Bereiche wurde eine höhere Rekombinations-Effizienz ins Genom erreicht.

Zur Kontrolle der Expression bestimmter Gene wurde der P3*nmt1*-Promotor nach Bähler *et al.* (1998) verwendet. Ein *nmt1*-Promotor ermöglicht eine Regulation der Genexpression in Abhängigkeit von der Thiamin-Konzentration. In Abwesenheit von Thiamin fand eine Expression der Gene statt, während die Zugabe von 2 - 5 mg/ml Thiamin zum Minimalmedium die Abschaltung der Gene bewirkte. Als Matrize diente hier das Plasmid pFA6A-*KanMX6-P3nmt1-3HA*, wodurch dem Zielgen auch die, für eine 3HA-Fusion kodierende, Sequenz angehängt wurde. Nach einer erfolgreichen homologen Rekombination des PCR-Produktes in das *S. pombe*-Genom wurde dem Zielgen so eine *KanMX6*-Resistenzkassette, der P3*nmt1*-Promotor und eine 3HA-Fusion vorgeschaltet.

4.3.20 Konstruktion von *S. pombe* Stämmen, die das 3HA-Tor1- bzw. 3HA-Tor2-Fusionsprotein produzieren

Da in *S. cerevisiae* und Säugern C-terminale Fusionen der TOR-Proteine nicht funktionell sind, wurden dem SpTor1- und SpTor2-Protein die 3HA-Fusionen N-terminal angehängt. Um die entsprechenden Gene *tor1*⁺ und *tor2*⁺ unter der Kontrolle ihres natürlichen Promotors zu exprimieren, wurden die Transformationskassetten über mehrere Klonierungsschritte hergestellt. Für einen *S. pombe* Stamm, der das 3HA-Tor1 produziert, wurde zunächst die Promotorregion von *tor1*⁺ mittels PCR amplifiziert und ebenso wie YCp111 mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Durch anschließende Ligation entstand das Plasmid pGC9. Dieses wurde, ebenso wie der 5' kodierende Bereich des *tor1*⁺ Gens, mit *Bam*HI und *Sac*I geschnitten und daraufhin ligiert. In das daraus resultierende (mit *Bam*HI linearisierte) Plasmid pGC10 wurde die vorher über PCR amplifizierte, 3HA-Sequenz *in vivo* rekombiniert. Das so entstandene Plasmid wurde pGC11 genannt und mit *Sna*BI linearisiert. Durch homologe Rekombination mit der *KanMX6*-Kassette wurde das Plasmid pGC12 gebildet. Die Restriktion von pGC12 mit *Sph*I und *Bsa*AI ergab ein 4144 bp großes DNA-Fragment. Nach Transformation von dem Stamm Sp34 mit diesem DNA-Fragment entstand ein Stamm, der 3HA-*tor1*⁺ unter der Kontrolle des natürlichen Promotors exprimiert. Die korrekte Integration der Transformationskassette wurde mittels PCRs mit den Oligonukleotiden „5'-tor1-HA-2.Ü-PCR“ und „3'-tor1-HA-Ü-PCR“ und „KanMX5'out“ und „3'-tor1-HA-Ü-PCR“ überprüft. Um einen Stamm zu erhalten, der Sp3HA-Tor2 herstellt, wurde auf ähnliche Weise verfahren. Die Promotorregion von *tor2*⁺ wurde mittels PCR amplifiziert und ebenso wie YCp111 mit *Asp*718I und *Hind*III geschnitten. Durch anschließende Ligation entstand das Plasmid pGC5. Dieses wurde, ebenso wie der 5' kodierende Bereich des *tor2*⁺ Gens, mit *Asp*718I und *Eco*RI geschnitten und daraufhin ligiert. In das daraus resultierende Plasmid (mit *Asp*718I linearisierte) pGC6 wurde, die vorher amplifizierte, 3HA-DNA durch homologe Rekombination integriert. Das so entstandene Plasmid wurde pGC7 genannt und mit *Bse*RI linearisiert. Durch homologe Rekombination mit der *KanMX6*-Kassette wurde das Plasmid pGC8 gebildet. Eine PCR mit den Primern „Tor1Trafo5gek“ und „Tor1Trafo3gek“ mit pGC8 als Matrize ergab die die 3096 bp große Transformationskassette. Durch homologe Rekombination in das Sp34 Genom entstand ein Stamm, der 3HA-*tor2*⁺ unter der Kontrolle des natürlichen Promotors exprimiert. Die korrekte Integration der Transformationskassette in das Genom wurde über PCR mit den Oligonukleotiden „5'-tor2-HA-2.Ü-PCR“ und „3'-tor2-HA-Ü-PCR“ und „KanMX5'out“ und „3'-tor2-HA-Ü-PCR“ überprüft.

4.3.21 Überprüfung der Stämme

Es wurde bei jedem Stamm, welcher ein Fusionsprotein produzierte, überprüft, ob die Integration dieser Fusion den Phänotyp des Stammes beeinflusst. Zunächst gaben Tetradenanalysen von Paarungen mit einem Wildtyp-Stamm (Sp34 oder Sp38) und Überprüfungs-PCRs Aufschluss darüber, ob die Transformationskassette nur einmal und am korrekten Locus integriert worden ist (Daten nicht gezeigt). Die Produktion des Fusionsproteins wurde durch Western Blot-Analysen der Rohextrakte und Immunpräzipitationen überprüft (Daten nicht gezeigt). Ebenso sollte sich die Generationszeit des Stammes nicht von der des Wildtyps unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Eventuelle phänotypische Auswirkungen der Fusion wurden durch Tropftests (Anhang 8.1) untersucht. Dabei wurde das Wachstum auf YE5SD, EMMD NH₄Cl und in Anwesenheit von Amilorid, Canavanin und Koffein analysiert. Wenn ein Stamm denselben Phänotyp wie der Wildtyp zeigte, wurde mit diesem weiter gearbeitet. Die Paarung eines konstruierten Stammes mit dem Wildtyp hatte, neben der oben genannten Überprüfung durch eine Tetradenanalyse, auch den Zweck, mögliche, durch die Transformation entstandene, Mutationen zu minimieren. Alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme produzierten das entsprechende Fusionsprotein und verhielten sich in den phänotypischen Analysen wie der Wildtyp.

4.3.22 Konstruktion von *S. pombe* Deletionsmutanten

Bei einer Gen-Deletion nach Bähler *et al.* (1998) wurden als Matrize entweder pCR2.1-hph, pFA6a-KanMX oder pCR2.1-nat (Tab. 4.3) verwendet. Nach der homologen Rekombination des PCR-Produktes in das *S. pombe*-Genom sollte das Gen deletiert und stattdessen die jeweilige Resistenzkassette integriert sein.

4.3.23 Tetradenanalyse

Um zwei haploide *S. pombe*-Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp (h^- oder h^+) zu paaren, wurden diese auf YE5SD-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Jeweils eine ca. traubenkerngroße Menge Zellen beider Stämme wurde in 200 µl sterilem H₂O resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf eine Malzagarplatte getropft und für 1 - 4 Tage bei 30°C inkubiert. Die Bildung der Tetraden wurde mikroskopisch überprüft. Bei einer erfolgreichen Paarung wurde eine kleine Menge Zellen in 100 µl sterilem H₂O aufgenommen und mit einer Impföse auf Vollmedium ausgestrichen. Mit Hilfe von einem Mikromanipulator („Manual MSM“, Singer Instruments) wurden die Tetraden gelegt und die einzelnen Sporen voneinander getrennt. Nach 2 - 3 tägiger Inkubation bei 30°C wurden die

ausgekeimten Sporen auf YE5SD ausgestrichen. Das Abstempeln dieser „Masterplate“ auf Selektivmedium-Agarplatten gab Aufschluss über den Genotyp der Sporen. Des Weiteren wurde der Paarungstyp der Sporen bestimmt (Kapitel 4.3.24).

4.3.24 Paarungstypbestimmung

Um den Paarungstyp von *S. pombe* Zellen zu bestimmen, wurde eine Übernachtskultur von *S. pombe* 38 (h^+) in YE5SD angezogen. Gleichzeitig wurde ein frischer Ausstrich der zu bestimmenden Zellen auf YE5SD über Nacht bei 30°C kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden je 20 µl der *S. pombe* 38-Kultur auf Malzagar getropft und in diesem Tropfen je ca. eine Zahnstocherspitze Zellmaterial des zu bestimmenden Stammes resuspendiert. Nach 1-tägiger Inkubation bei 30°C konnte man eine mögliche Tetradenbildung mikroskopisch untersuchen und daraufhin auf den Paarungstyp der Zellen schließen.

4.3.25 Herstellung von Rohextrakten von *S. pombe* -Zellen

Zur Analyse von Proteinen wurden Rohextrakte der Hefezellen hergestellt. Eine Zellkultur wurde bei einer OD_{600nm} 0,7 -1 geerntet und mit H_2O gewaschen (4 min, 1700 x g, 4°C). Ab der Zellernte wurde stets auf Eis gearbeitet. Die Pellets wurden, falls nicht anders angegeben, in folgendem Lysispuffer mit Inhibitoren aufgenommen: 1 x TBS; 0,5 % Tween; 10 % Glycerin; 1 mM PMSF; 1 x Protease Inhibitoren („Protease Inhibitor Cocktail“-Tabletten, Roche); 1 x Phosphatase- Inhibitoren- Mix (25 x: 100 mM NaF; 100 mM NaN_3 ; 100 mM p-Nitrophenylphosphat; 100 mM Tetrasodiumpyrophosphat; 100 mM β -Glycerophosphat). Dieser Suspension wurden ca. 400 µl Glasperlen ($\varnothing = 0,45 - 0,5$ mm) zugegeben, damit die Zellen während der 30 min auf dem „Disruptor Genie“ (Scientific Industries) aufgeschlossen werden konnten. Nach dem Aufschluss wurde die Suspension zentrifugiert (4 min, 1700 x g, 4°C), der Überstand abgenommen und die Glasperlen mit je 300 µl Lysispuffer mit Inhibitoren gewaschen (4 min, 1700 x g, 4°C). Der Überstand des zweiten Zentrifugationsschrittes wurde nun mit dem des Ersten vereinigt. Das Reaktionsgefäß, in welchem sich die verbliebenen Glasperlen befanden, wurde unten mit einer heißen Kanüle („Sterican“, Größe 1, Braun) angestochen und in ein größeres Reaktionsgefäß gesetzt. Nach einem kurzen Abzentrifugieren bei 4°C wurde der resultierende Durchfluss mit den vorherigen Überständen vereinigt und dieses Lysat erneut zentrifugiert (4 min, 1700 x g, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und als Rohextrakt weiterverwendet. Um die Rohextrakt-Proben auf ein SDS-Gel aufzutragen, wurden zu 40 µl Rohextrakt je 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer (312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 50% Glycerin; 0,01%

Bromphenolblau; 25% β -Mercaptoethanol) gegeben und 5 min bei 96°C und 1400 rpm (Eppendorf, „Thermomixer comfort“) gekocht. Die Proben wurden direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

4.3.26 Proteinbestimmung

Die Gesamtproteinkonzentration eines Rohextraktes wurde mit Hilfe des „Protein Assay“ von Biorad nach Angaben des Herstellers bestimmt. Für die Eichgerade wurden verschiedene Konzentrationen (0, 2, 4, 6, 8, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Rinderserum-Albumin (BSA) eingesetzt.

4.3.27 Immunpräzipitation von Fusionsproteinen

Um ein Fusionsprotein zu präzipitieren, wurden 1 – 15 mg Gesamtprotein eingesetzt. Das eingesetzte Volumen an Rohextrakt wurde mit Lysispuffer mit Inhibitoren auf 1 ml aufgefüllt. Bei „TAP“-Fusionsproteinen wurden 20 μl IgG-Sepharose (Amersham) zugegeben und die Proben mindestens 2 h bei 4°C auf einem Rad inkubiert. Enthielt das Fusionsprotein mit GFP-, 3HA- oder 13myc-Sequenz, wurde der Rohextrakt zunächst mit dem entsprechenden Antikörper mindestens eine halbe Stunde inkubiert (Rad, 4°C). Danach wurden je 20 μl Protein G-Sepharose zugegeben und die Proben mindestens 90 min bei 4°C auf dem Rad gedreht. Die Proben wurden anschließend mindestens drei (Immunpräzipitation) bis zehn Mal (Ko-Immunpräzipitation) mit Lysispuffer gewaschen (3 min, 960 x g, 4°C). Nach dem letzten Waschen wurde die Sepharose vollständig mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt und anschließend in 18 μl 2x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 0,004 % Bromphenolblau; 10 % β -Mercaptoethanol) aufgenommen. Die Proben wurden 5 min bei 96°C und 1400 rpm (Eppendorf, „Thermomixer comfort“) gekocht, bevor sie auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert wurden.

Um unspezifische Bindungen von Proteinen an die IgG-Beads bzw. Protein G-Sepharose zu minimieren, ging der Immunpräzipitation gegebenenfalls ein „Preclearing“-Schritt voraus. Dabei wurden den Proben 20 μl CL4B-Sepharose (Sigma) bzw. 20 μl Protein G-Sepharose zugegeben und für 30 min bei 4°C auf dem Rad inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Sepharose (4 min, 1700 x g, 4°C) wurde mit dem Überstand die Immunpräzipitation durchgeführt.

4.3.28 Subzelluläre Fraktionierung

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation eines Proteins wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt. Dazu wurden zunächst Rohextrakte der Zellen, wie unter Kapitel

4.3.25 beschrieben, hergestellt und eine bestimmte Menge Gesamtprotein eingesetzt. Zum Einen wurde mit einer Probe eine Immunpräzipitation durchgeführt, während mit einer weiteren Probe, mit der gleichen Menge an Gesamtprotein, die Fraktionierung erfolgte. Zur Fraktionierung wurde die Probe 5 min bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde als erstes „low speed pellet“ in 18 µl 2 x Probenpuffer aufgenommen und 5 min, 96°C und 1.400 rpm (Eppendorf, „Thermomixer comfort“) gekocht. Der Überstand wurde daraufhin 5 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde als zweites „low speed pellet“ bezeichnet und ebenfalls bei 96°C für 5 min und 1400 rpm (Eppendorf, „Thermomixer comfort“) gekocht, nachdem es in 18 µl 2 x Probenpuffer resuspendiert wurde. Der Überstand wurde anschließend bei 70.000 rpm (Rotor TLA 100.1), 1 h bei 4°C in einer Ultrazentrifuge („Optima“ Beckman Coulter) zentrifugiert. Während in den vorangegangenen niedertourigen Zentrifugationsschritten Zelltrümmer pelletiert wurden, sollte sich durch die Ultrazentrifugation die cytosolische Fraktion (Überstand) von der Fraktion der Membranbestandteile und membranassoziierten Proteine (Pellet) trennen. Nachdem sowohl der Überstand, als auch das Pellet in 1 ml Lysispuffer mit Inhibitoren gelöst wurde, wurden Immunpräzipitationen durchgeführt. In einer anschließenden SDS-PAGE wurden die einzelnen Fraktionen aufgetragen und anhand dem Vorhandensein bzw. der Intensität der spezifischen Proteinbande Aussagen über die Lokalisation des Proteins getroffen.

4.3.29 Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus von SpGad8

Um die Phosphorylierung von SpGad8 zu analysieren, wurden die Zellen zunächst in 250 ml YE5S bis zu einer OD_{600nm} 0,8 - 1 kultiviert. Vor der Zugabe von Rapamycin wurden 50 ml der Kultur entnommen (T_0), die Zellen abfiltriert (Millipore, Type HA, 0,45 µm) und mindestens 15 min bei -80°C eingefroren. Zu den restlichen Zellen wurden 100 ng/ml Rapamycin gegeben und nach 15 min (T_{15}), 30 min (T_{30}), 60 min (T_{60}), 120 min (T_{120}) jeweils 50 ml Kultur entnommen und, wie für den Zeitpunkt T_0 beschrieben, behandelt. Der Phosphorylierungsstatus von SpGad8 wurde auf verschiedene Weise untersucht. Falls phosphoryliertes SpGad8 in einem Western Blot mittels anti-phospho-Serin-Antikörper detektiert oder ein SDS-Gel mit einer geringeren Acrylamid-Bisacrylamidvernetzung verwendet wurde, wurden die abfiltrierten Zellen nach der in 4.3.25 beschriebenen Methode behandelt. Dabei wurde ein weiterer Lysispuffer verwendet (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM KCl; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % Glycerol; 1 % SDS nach Matsuo *et al.*, 2003). Um die Phosphorylierung von SpGad8 mittels „Phostag“-Gel (4.3.35) zu untersuchen, wurde ebenfalls nach 4.3.25 verfahren, der von Matsuo *et al.* beschriebene Lysispuffer wurde

modifiziert eingesetzt (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 mM DTT; 10 % Glycerol; 1 % SDS; 20 mM NaCl). Hier wurde auf EDTA verzichtet, um eine mögliche Komplexierung der Mangan-Ionen mit EDTA im „Phostag“-Gel zu vermeiden. Außerdem wurde bei „Phostag“-Gelen eine relativ niedrige Salzkonzentration der Proben gewährleistet.

4.3.30 Dephosphorylierung von Proteinen

Zur Dephosphorylierung von Proteinen wurde die λ -Proteinphosphatase (NEB) nach Herstellerangaben benutzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Lysispuffer ohne Inhibitoren auf 50 μ l aufgefüllt.

4.3.31 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einem SDS-Gel wurden die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). In dieser Arbeit wurde das „Mini-Protean 3 System“ von Biorad gemäß den Herstellerangaben verwendet. Bei dem Sammelgel handelte es sich um ein 1,8 %-iges Acrylamid-Gel, während die Konzentrationen des Trenngels zwischen 5 und 15 % Acrylamid variierten. Falls nicht anders angegeben wurde mit einer Acrylamid:Bisacrylamidvernetzung von 37,5:1 gearbeitet. Tabelle 4. 10 zeigt die Zusammensetzung von Sammel- und verschiedenen Trenngelen. Dabei sind die Volumina für jeweils 4 Gele angegeben. Die Gelkammer wurde mit 1x Laufpuffer (5x Laufpuffer: 0,95 M Glycin; 115 mM Tris; 5,7 mM EDTA; 0,25 % SDS) gefüllt. Nach dem Beladen des Gels mit einem Proteinstandard („Precision Plus Protein Standard: All Blue“ der Firma Biorad; „Pageruler Prestained Protein Ladder“ der Firma Fermentas) und den Proben erfolgte die SDS-PAGE bei 90- 140 V für 1,5- 3 h. Falls die Elektrophorese über Nacht lief, wurde eine Spannung von 10 V gewählt.

Tabelle 4. 10: Zusammensetzung der SDS-Gele (ausreichend für 4 Gele)

%	H ₂ O	4x Trenngelpuffer (8 mM EDTA; 4 % SDS; 1,5 M Tris-HCl pH8,8)	4x Sammelgelpuffer (8 mM EDTA; 4 % SDS; 0,5 M Tris-HCl pH6,8)	Acryl- amid/ Bisacryl- amid (Vernetzung 37,5:1)	99 % TEMED	10 % APS
1,8	7 ml	0 ml	3 ml	3 ml	15 µl	150 µl
5	11,7 ml	5 ml	0 ml	3,3 ml	10 µl	200 µl
7,5	10 ml	5 ml	0 ml	5 ml	10 µl	200 µl
10	8,4 ml	5 ml	0 ml	6,6 ml	10 µl	200 µl
12,5	6,6 ml	5 ml	0 ml	8,4 ml	10 µl	200 µl
15	5 ml	5 ml	0 ml	10 ml	10 µl	200 µl

4.3.32 Western Blot-Analyse

Zur Detektion der Proteine wurde ein Western Blot durchgeführt (Burnette *et al.*, 1981). Nach der elektrophoretischen Auftrennung (Kapitel 4.3.31) erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran („Protran“, Schleicher und Schuell). Es wurde die „Mini-Transblot-Electrophoretic Transfer Cell“ von Biorad gemäß den Herstellerangaben, verwendet. Der Blot aus SDS-Gel, Nitrocellulose, Filterpapieren („Blotting-Papiere“, 580 - 600 mm, Neolab) und Faserstoff wurde wie von Burnette *et al.* (1981) beschrieben aufgebaut. Der Transfer erfolgte in einer mit 1 x Blotpuffer (25 mM Tris; 152 mM Glycin; 20 % Methanol; 0,1 % SDS) gefüllten Kammer für 2 - 2,5 h bei 25 V. Zum Nachweis von Proteinen wurde die Membran zunächst 30 min in TBS (25 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl; pH 7,6) + 0,1 % Tween und 5 % Milchpulver bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Danach wurde der erste Antikörper hinzugegeben. Die verschiedenen Antikörperverdünnungen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Die Inkubation dauerte 1,5- 4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C, jeweils unter leichtem Schütteln. Vor der Zugabe des zweiten Antikörpers wurde die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS+ 0,1% Tween gewaschen. Der zweite Antikörper (Tabelle 4.1) wurde 1:5.000 oder 1:10.000 in TBS+ 0,1 % Tween verdünnt und die Membran 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran erneut mit TBS+ 0,1% Tween gewaschen (dreimal 5 min). Daran schloss sich die Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz nach Herstellerangaben („ECL Western Blotting

Detection Reagents“, Amersham) an. Durch Auflegen eines Film („Hyperfilm“, Amersham) und dessen Entwicklung konnten Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

Eine andere Nachweismethode erfolgte mit Hilfe des „Odyssey Western Blot Analysis“-Systems. Dazu wurde die Membran bis zur Zugabe des zweiten Antikörpers entsprechend der Detektion mittels Chemilumineszenz behandelt. Der zweite Antikörper (Tabelle 4.1) wurde 1:5.000 bzw. 1:10.000 in TBS + 0,1 % Tween und 5 % Milchpulver verdünnt und die Membran 1 h bei RT leicht geschüttelt. Die Membran wurde daraufhin dreimal 5 min mit TBS+ 0,1 % Tween und zweimal 5 min mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit einem „Licor“-Scanner und dem „Odyssey“-Programm gescannt und auf diese Weise die fluoreszierenden Banden entweder bei 700 nm oder 800 nm visualisiert.

4.3.33 „Strippen“ eines Western Blots

Sollte eine Western Blot-Membran mit einem weiteren ersten Antikörper analysiert werden, wurde die Membran „gestrippt“. Um die an die Membran gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran zunächst 30 min bei 50°C in „stripping buffer“ (100 mM β -Mercaptoethanol; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 2 % SDS) unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Nach zweimaligem 10-minütigen Waschen der Membran in TBS + 0,1 % Tween, wurde die Membran auf einer Wippe 1 h in TBS + 0,1 % Tween und 5 % Milchpulver blockiert. Daraufhin konnte mit der Detektion der Proteine, wie unter 4.3.32 beschrieben, ab dem ersten Antikörper verfahren werden.

4.3.34 Verwendung eines SDS-Gels mit einem niedrigeren Acrylamid-Bisacrylamid-Vernetzungsgrad

Um Proteinmodifikationen zu analysieren, die in SDS-Gelen mit einem Acrylamid-Bisacrylamid-Verhältnis von 37,5:1 (Rotiphorese Gel 30, Roth) nicht sichtbar getrennt werden können, wurden SDS-Gele mit einem anderen Vernetzungsgrad verwendet. Dabei ist ein Acrylamid-Bisacrylamid-Verhältnis von 149:1 („low crosslinker“-Gel) gewählt worden. Dieses Verhältnis wurde durch Mischen von Rotiphorese Gel A (Acrylamidlösung 30%, Roth) und Rotiphorese Gel B (Bisacrylamidlösung 2%, Roth) erzielt. Durch diesen niedrigen Vernetzungsgrad ist möglicherweise eine bessere Auftrennung der einzelnen Banden, die verschiedene Modifikationszustände darstellen, zu beobachten.

4.3.35 „Phos-tag“-Gele

Um verschiedene Phosphorylierungszustände eines Proteins sichtbar voneinander zu trennen, können sogenannte „Phostag“-Gele verwendet werden (Kinoshita *et al.*, 2006). Ein „Phostag“-Gel ist ein SDS-Gel, dem zusätzlich Mn^{2+} -Ionen und eine „Phos-tag“-Lösung zugegeben werden (Tab. 4.11). Dabei binden die Moleküle der „Phos-tag“-Lösung sowohl an das Acrylamid als auch an die dinukleären Mn^{2+} -Ionen. Diese Mn^{2+} -Ionen binden wiederum Phosphomonoester-Dianionen von Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten. Während der elektrophoretischen Auftrennung binden somit phosphorylierte Proteine an den „ Mn^{2+} -Phostag“ und zeigen ein verändertes Laufverhalten gegenüber nicht phosphorylierten Proteinen (Kinoshita *et al.*, 2006). Um eine Komplexbildung der Mn^{2+} -Ionen zu verhindern, wurden sowohl Trenngelpuffer als auch Sammelgelpuffer und Laufpuffer ohne EDTA (25 mM Tris, pH 8,4; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS) verwendet. Vor der Western Blot-Analyse wurde das SDS-Gel 10 min in Blotpuffer (10x Blotpuffer: 25 mM Tris; 152 mM Glycin; 20 % Methanol; 0,1 % SDS) + 1 mM EDTA gewaschen, um durch die Eliminierung der Mn^{2+} -Ionen eine effiziente Blotting der Proteine zu gewährleisten. Vor dem Western Blot wurde das SDS-Gel weitere 10 min nur in Blotpuffer gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden, wie unter Kapitel 4.3.33 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 4.11: Zusammensetzung von 50 μ mol/l Phostag-Gelen (ausreichend für 2 Gele). Als Sammelgel wurde ein 4,5 %iges Gel, als Trenngel ein 10 %iges Gel verwendet.

% Acrylamid	4,5 %	10 %
H₂O	5,3 ml	3,5 ml
4x Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % SDS)	0 ml	3,5 ml
4x Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4 % SDS)	2,5 ml	0 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1)	2,2 ml	7 ml
MnCl₂	0 ml	140 μ l
PhostagTM-AAL-Lösung	0 ml	140 μ l
99 % TEMED	11,6 μ l	7 μ l
10 % APS	116 μ l	140 μ l

5 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit war durch zahlreiche Studien die bedeutende Rolle von TOR für das Zellwachstum ebenso wie die Existenz von zwei TOR-Komplexen, sowohl in Säugern (Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Sarbassov *et al.*, 2004) als auch in der knospenden Hefe *S. cerevisiae* (Loewith *et al.*, 2002; Wullschlegler *et al.*, 2005) bekannt. Während der knospenden Hefe der bedeutende regulatorische TSC-Komplex fehlt, wusste man bereits von einem TSC-Komplex in der Spalthefe *S. pombe* (Mach *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2002) und dass dieser Komplex, wie in Säugern, die kleine GTPase SpRhb1 negativ reguliert (Yang *et al.*, 2001; van Slegtenhorst *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2005; Nakase *et al.*, 2006). Zunächst sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob in *S. pombe* die TOR-Komplexe ebenfalls konserviert sind.

5.1 Konservierung der TOR-Komplexe in *S. pombe*

5.1.1 Existenz von homologen Proteinen der TOR-Komplex Mitglieder

Die Existenz von zwei TOR-Proteinen, SpTor1 und SpTor2 war zu Beginn dieser Arbeit bekannt (Weisman und Choder, 2001). Anhand der Sequenzhomologien ist zu vermuten, dass SpTor1 das Homologe zu ScTOR2, während SpTor2 das homologe Protein zu ScTOR1 ist. Datenbankrecherchen ergaben, dass in *S. pombe* auch homologe Proteine der weiteren TOR-Komplex-Mitglieder aus Säugern und *S. cerevisiae* annotiert sind. Folgende Proteine bilden möglicherweise TOR-Komplexe in *S. pombe*: SpTor1 (ScTOR2, mTOR), SpTor2 (ScTOR1, mTOR), SpMip1 (ScKOG1, mRaptor), SpSte20 (ScAVO3, mRictor), SpSin1 (ScAVO1, mSin1), SpWat1 (ScLST8, mLst8). Im Anhang 8.2 sind die Sequenzvergleiche der jeweiligen homologen Proteine aufgelistet. In Tabelle 5.1 sind die Daten der Sequenz-Vergleiche zusammengefasst.

Tabelle 5. 1: Vergleich der Aminosäuresequenzidentitäten zwischen Säuger- und *S. cerevisiae* – Proteinen und Säuger- und *S. pombe* Proteinen

% Identität des <i>S. cerevisiae</i> Proteins verglichen mit dem Säuger-Homolog	<i>S. cerevisiae</i>	Säuger	<i>S. pombe</i>	% Identität des <i>S. pombe</i> Proteins verglichen mit dem Säuger-Homolog
39/ 41	ScTOR1/ ScTOR2	mTOR	SpTor1/SpTor2	45/ 48
37	ScKOG1	mRaptor	SpMip1	40
47	ScLST8	mLST8	SpWat1	45
17	ScAVO3	mRictor	SpSte20	21
10	ScAVO1	mSin1	SpSin1	14

5.1.2 Existenz und Zusammensetzung von TOR-Komplexen in *S. pombe*

Um zu untersuchen, ob in *S. pombe* ebenfalls TOR-Komplexe existieren, wurden Interaktionsstudien mit folgenden Proteinen durchgeführt: SpTor1, SpTor2, SpSte20, SpSin1, SpMip1 und SpWat1. Mögliche Interaktionen von Proteinen wurden mittels Ko-Immunpräzitationen und anschließenden Western Blot-Analysen untersucht. Für die Expressionskontrollen wurde bei den Immunpräzitationen und Western Blot-Analysen die Sepharose bzw. der Antikörper entsprechend des jeweiligen Fusionsproteins verwendet. Bei den Ko-Immunpräzitationen wurde eines der beiden untersuchten Proteine präzitiert, um anschließend eine mögliche Interaktion durch die Verwendung eines Antikörpers gegen das zweite Fusionsprotein in Western Blot-Analysen nachzuweisen bzw. auszuschließen. Die folgenden Ergebnisse wurden mindestens dreimal verifiziert.

5.1.2.1 Interaktion von SpTor2 und SpMip1

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Proteine SpTor2 und SpMip1 miteinander interagieren. Für die Ko-Immunpräzitationen wurden Stämme verwendet, die *mip1*⁺-TAP, *3HA-tor2*⁺ oder *mip1*⁺-TAP und *3HA-tor2*⁺ exprimieren. In Abbildung 5.1 sind die Expressionskontrollen sowohl für SpMip1 als auch für SpTor2 zu erkennen. Das Signal bei der Ko-Immunpräzitation von SpTor2 deutet auf eine Interaktion von SpTor2 und SpMip1 hin.

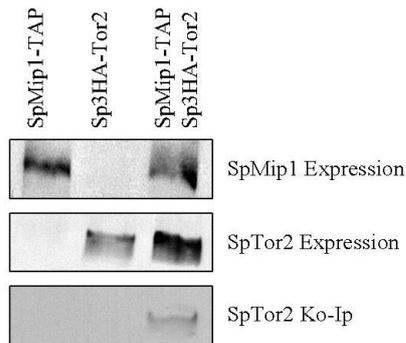


Abbildung 5.1: Ko-Immunpräzipitation von SpTor2 und SpMip1. Rohextrakte von Zellen, die *mip1*⁺-TAP (SPGC2-3A), *3HA-tor2*⁺ (SPGC18-1B) oder *mip1*⁺-TAP und *3HA-tor2*⁺ (SPGC26-5B) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1 mg (Expressionskontrollen SpMip1-TAP), 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor2) bzw. 15 mg (Ko-Immunpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 µl IgG-beads bzw. 3 µl anti-HA (30 min) und 30 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.2 Interaktion von SpTor2 und SpWat1

Für diese Ko-Immunpräzipitationen wurden Stämme verwendet, die *wat1*⁺-TAP, *3HA-tor2*⁺ oder *wat1*⁺-TAP und *3HA-tor2*⁺ exprimieren. Wie in Abbildung 5.2 zu sehen, werden beide Fusionsproteine produziert. Das Signal für ko-immunpräzipitiertes SpTor2 zeigt eine Bindung dessen an SpMip1 an.

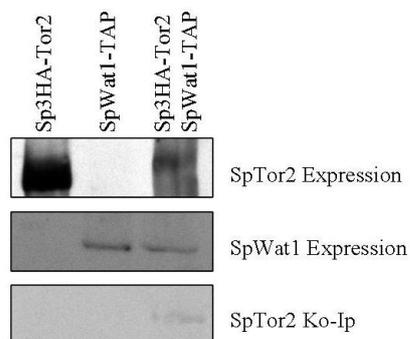


Abbildung 5.2: Ko-Immunpräzipitation von SpTor2 und SpWat1. Rohextrakte von Zellen, die *wat1*⁺-TAP (SPGC9-2C), *3HA-tor2*⁺ (SPGC18-1B) oder *wat1*⁺-TAP und *3HA-tor2*⁺ (SPGC23-4C) exprimierten, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor2) bzw. 15 mg (Ko-Immunpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 µl IgG-beads bzw. 3 µl anti-HA (30 min) und 30 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-Protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Als SpWat1-TAP Expressionskontrollen sind 10 µg Rohextrakte aufgetragen worden. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.3 Interaktion von SpMip1 und SpWat1

Für die Ko-Immunpräzipitationen wurden Stämme verwendet, die *mip1*⁺-13myc, *wat1*⁺-3HA oder *mip1*⁺-13myc und *wat1*⁺-3HA exprimieren. In Abbildung 5.3 sind die dazugehörigen Western Blot-Analysen dargestellt. Die Expressionskontrollen von *mip1*⁺-13myc und *wat1*⁺-3HA sind deutlich zu erkennen. Das Signal von SpWat1 auf dem Blot der Ko-Immunpräzipitation weist eine Bindung von SpWat1 an SpMip1 nach.

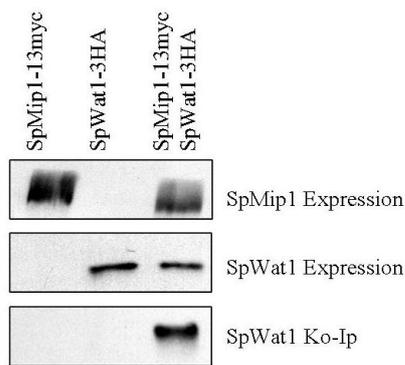


Abbildung 5.3: Ko-Immünpräzipitation von SpMip1 und SpWat1. Rohextrakte von Zellen, die *mip1⁺-13myc* (SPGC3), *wat1⁺-3HA* (SPGC7-1C) oder *mip1⁺-13myc* und *wat1⁺-3HA* (SP10-1B) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 2 mg (Expressionskontrollen SpMip1-13myc) bzw. 15 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 1 μ l anti-HA bzw. 1 μ l anti-myc (je 30 min) und 20 μ l Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-HA (1:10.000) bzw. anti-myc (1:10.000) eingesetzt. Als SpWat1-TAP Expressionskontrollen sind 10 μ g Rohextrakte aufgetragen worden. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.4 Keine Interaktion von SpTor2 und SpSte20

Für die Ko-Immünpräzipitationen wurden Stämme verwendet, die *3HA-tor2⁺*, *ste20⁺-TAP* oder *3HA-tor2⁺* und *ste20⁺-TAP* exprimieren. In Abbildung 5.4 sind deutliche Signale bei den Kontrollen für die Produktion von Sp3HA-Tor2 und SpSte20-3HA zu sehen. Da keine Bande bei der Ko-Immünpräzipitation zu erkennen ist, ist davon auszugehen, dass SpTor2 und SpSte20 nicht aneinander binden.

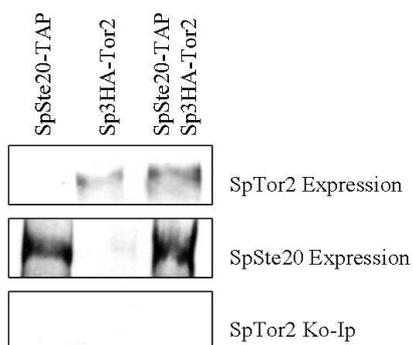


Abbildung 5.4: Keine Ko-Immünpräzipitation von SpTor2 und SpSte20. Rohextrakte der Zellen, die *3HA-tor2⁺* (SPGC18-1B), *ste20⁺-TAP* (SPGC5-4C) oder *3HA-tor2⁺* und *ste20⁺-TAP* (SPGC22-3C) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor2), 1 mg (Expressionskontrollen SpSte20-TAP) bzw. 15 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 μ l IgG-beads bzw. 3 μ l anti-HA (30 min) und 30 μ l Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-Protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.5 Keine Interaktion von SpTor2 und SpSin1

Für anschließende Ko-Immünpräzipitationen wurden Stämme verwendet, die entweder Sp3HA-Tor2, SpSin1-TAP oder beide Fusionsproteine produzieren. Abbildung 5.5 zeigt die jeweiligen Expressionskontrollen. Es konnte jedoch kein SpTor2-Signal bei der Ko-Immünpräzipitation detektiert werden. Somit liegt keine Interaktion von SpTor2 und SpSin1 vor.

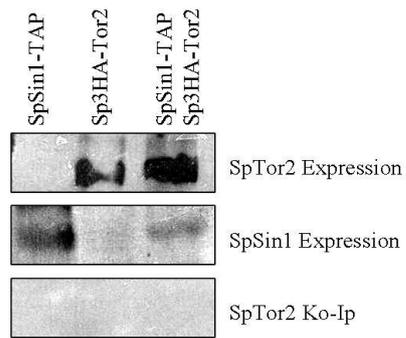


Abbildung 5.5: Keine Ko-Immünpräzipitation von SpTor2 und SpSin1. Rohextrakte der Zellen, die *3HA-tor2⁺* (SPGC18-1B), *sin1⁺-TAP* (SPGC15-2B) oder *3HA-tor2⁺* und *sin1⁺-TAP* (SPGC24-1C) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1 mg (Expressionskontrollen SpSin1-TAP), 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor2) bzw. 15 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 30 μ l IgG-beads bzw. 3 μ l anti-HA (30 min) und 20 μ l Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.6 Keine Interaktion von SpMip1 und SpSte20

Es wurden Ko-Immünpräzipitationen mit Stämmen durchgeführt, die entweder *mip1⁺-TAP⁺*, *ste20⁺-3HA⁺* oder beide Gene exprimieren. Abbildung 5.6 zeigt die Ergebnisse dieser Immunpräzipitationen. Während für die Expressionskontrollen deutliche Signale zu erkennen sind, zeigt sich bei der Ko-Immünpräzipitation keine Proteinbande. Somit handelt es sich bei SpMip1 und SpSte20 nicht um Interaktionspartner.

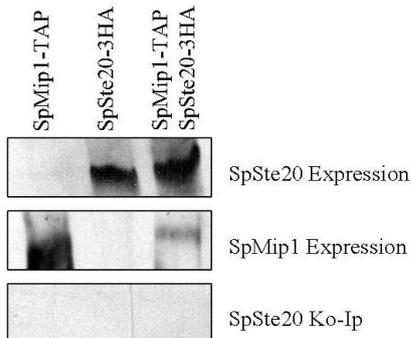


Abbildung 5.6: Keine Ko-Immünpräzipitation von SpMip1 und SpSte20. Rohextrakte der Zellen, die *mip1⁺-TAP* (SPGC2-3A), *ste20⁺-3HA* (SPGC8-3A) oder *mip1⁺-TAP* und *ste20⁺-3HA* (SPGC28-4D) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1 mg (Expressionskontrollen SpMip1-TAP), 2 mg (Expressionskontrollen SpSte20-3HA) bzw. 7,5 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 μ l IgG-beads bzw. 1 μ l anti-HA (30 min) und 20 μ l Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:10.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.7 Keine Interaktion von SpMip1 und SpSin1

Die Ko-Immünpräzipitationen erfolgten mit Stämmen, die entweder *mip1⁺-13myc*, *sin1⁺-TAP* oder *mip1⁺-13myc* und *sin1⁺-TAP* (SPGC27-6A) exprimieren. In Abbildung 5.7 sind die Expressionskontrollen für *mip1⁺-13myc* und *sin1⁺-TAP* zu sehen. Es ist kein SpSin1-Signal bei der Ko-Immünpräzipitation vorhanden. Die Proteine SpMip1 und SpSin1 interagieren demnach nicht miteinander.

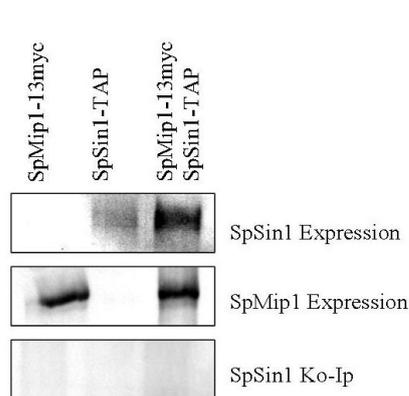


Abbildung 5.7: Keine Ko-Immunitipitation von SpMip1 und SpSin1. Rohextrakte der Zellen, die *mip1*⁺-myc (SPGC3), *sin1*⁺-TAP (SPGC15-2B) oder *mip1*⁺-myc und *sin1*⁺-TAP (SPGC27-6A) exprimieren, wurden Immunprazipitationen unterzogen. Es wurden 2 mg (Expressionskontrollen SpMip1-13myc), 1 mg (Expressionskontrollen SpSin1-TAP) bzw. 7,5 mg (Ko-Immunitipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Prazipitationen erfolgten mit 20 µl IgG-beads bzw. 1 µl anti-myc (30 min) und 20 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-myc (1:10.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.8 Existenz eines TOR-Komplex 1

Es konnten Interaktionen zwischen folgenden Proteinen beobachtet werden: SpTor2 und SpMip1 (Abbildung 5.1); SpTor2 und SpWat1 (Abbildung 5.2); SpMip1 und SpWat1 (Abbildung 5.3). Keine Interaktionen waren zwischen den Proteinen: SpTor2 und SpSte20 (Abbildung 5.4); SpSin1 und SpTor2 (Abbildung 5.5); SpMip1 und SpSte20 (Abbildung 5.6); SpMip1 und SpSin1 (Abbildung 5.7) zu sehen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5.8 schematisch zusammengefasst und deuten auf die Existenz eines TOR-Komplex 1 hin.

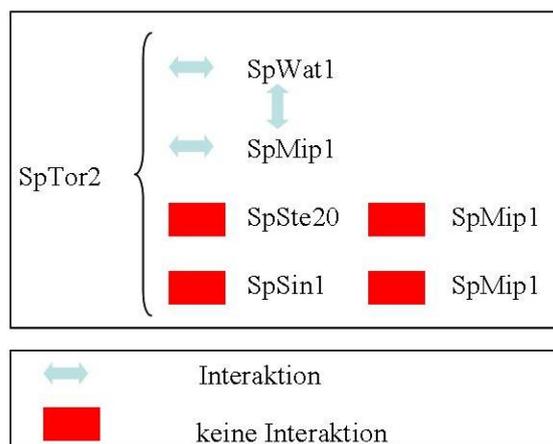


Abbildung 5.8: Zusammenfassung der Ko-Immunitipitationen.

5.1.2.9 Interaktion von SpTor1 und SpSin1

Es wurden Ko-Immunitipitationen mit Stämmen durchgeführt, die entweder Sp3HA-Tor1, SpSin1-TAP oder beide Proteine produzieren. In Abbildung 5.9 ist zu erkennen, dass sowohl Sp3HA-Tor1 als auch SpSin1-TAP in den entsprechenden Stämmen produziert werden. Das deutliche Signal von Sp3HA-Tor1 weist auf eine Interaktion von Sp3HA-Tor1 und SpSin1-TAP hin.

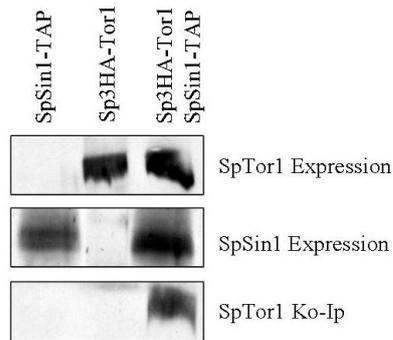


Abbildung 5.9: Ko-Immünpräzipitation von SpTor1 und SpSin1. Rohextrakte der Zellen, die *3HA-tor1*⁺ (SPGC29-3), *sin1*⁺-TAP (SPGC15-2B) oder *3HA-tor1*⁺ und *sin1*⁺-TAP (SPGC33-1B) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1 mg (Expressionskontrollen SpSin1-TAP), 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor1) bzw. 15 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 µl IgG-beads bzw. 3 µl anti-HA (30 min) und 30 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.10 Interaktion von SpTor1 und SpSte20

Für die Ko-Immünpräzipitationen wurden Stämme verwendet, die entweder *3HA-tor1*⁺, *ste20*⁺-TAP oder beide Gene exprimieren. Die Kontrollen der *3HA-tor1*⁻ und *ste20*⁺-TAP-Expression sind in Abbildung 5.10 zu erkennen. Ebenso ist ein Signal bei der Ko-Immünpräzipitation von Sp3HA-Tor1 zu sehen, welches auf Sp3HA-Tor1 und SpSte20-TAP als Interaktionspartner hindeutet.

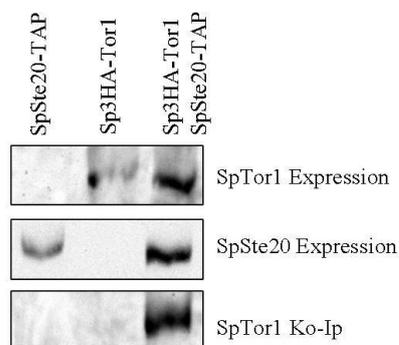


Abbildung 5.10: Ko-Immünpräzipitation von SpTor1 und SpSte20. Rohextrakte der Zellen, die *3HA-tor1*⁺ (SPGC29-3), *ste20*⁺-TAP (SPGC5-4C) oder *3HA-tor1*⁺ und *ste20*⁺-TAP (SPGC32-3D) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1 mg (Expressionskontrollen SpSte20-TAP), 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor1) bzw. 15 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 µl IgG-beads bzw. 3 µl anti-HA (30 min) und 30 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.11 Interaktion von SpTor1 und SpWat1

Es wurden Ko-Immünpräzipitationen mit den Stämmen durchgeführt, die entweder Sp3HA-Tor1, SpWat1-GFP oder beide Fusionsproteine produzieren. In Abbildung 5.11 sind sowohl die Expressionskontrollen, als auch ein Signal für eine erfolgreiche Ko-Immünpräzipitation von Sp3HA-Tor1 zu erkennen. Daher handelt es sich bei Sp3HA-Tor1 und SpWat1-GFP um Bindungspartner.

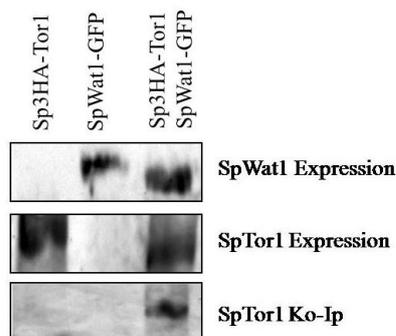


Abbildung 5.11: Ko-immunpräzipitation von SpTor1 und SpWat1. Rohextrakte der Zellen, die *3HA-tor1*⁺(SPGC29-3), *wat1*⁺-GFP (SPGC21-1B) oder *3HA-tor1*⁺ und *wat1*⁺-GFP (SPGC36-2D) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor1) bzw. 15 mg (Ko-Immunpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 2 µl anti-GFP bzw. 3 µl anti-HA (je 30 min) und 30 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-GFP (1:5.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Als SpWat1-3HA Expressionskontrollen sind 15 µg Rohextrakte aufgetragen worden. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.12 Interaktion von SpSin1 und SpSte20

Die Ko-Immunpräzipitationen wurden mit den Stämmen durchgeführt, die entweder SpSin1-3HA, SpSte20-TAP oder beide Proteine produzieren. Dieses wurde durch die Kontrollen in Abbildung 5.12 bestätigt. Dort ist auch ein deutliches Signal für ko-immunpräzipitiertes SpSte20-TAP zu erkennen. Die beiden untersuchten Proteine interagieren somit miteinander.

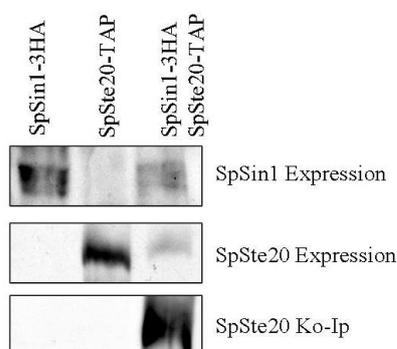


Abbildung 5.12: Ko-Immunpräzipitation von SpSin1 und SpSte20. Rohextrakte der Zellen, die *sin1*⁺-3HA (SPGC12-2), *ste20*⁺-TAP (SPGC5-4C) oder *sin1*⁺-3HA und *ste20*⁺-TAP (SPGC30-1A) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1 mg (Expressionskontrollen SpSte20-TAP), 2 mg (Expressionskontrollen SpSin1-3HA) bzw. 7,5 mg (Ko-Immunpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 µl IgG-beads bzw. 1 µl anti-HA (30 min) und 20 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:10.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.13 Interaktion von SpSin1 und SpWat1

Die Ko-Immunpräzipitationen erfolgten mit Stämmen, die entweder *sin1*⁺-TAP, *wat1*⁺-3HA oder *sin1*⁺-TAP und *wat1*⁺-3HA exprimieren. Die Expressionskontrollen der beiden Fusionsproteine sind in Abbildung 5.12 bei den jeweiligen Stämmen vorhanden. Das Signal von SpSin1-TAP bei der Ko-Immunpräzipitation deutet eine Interaktion von SpSin1-TAP und SpWat1-3HA an.

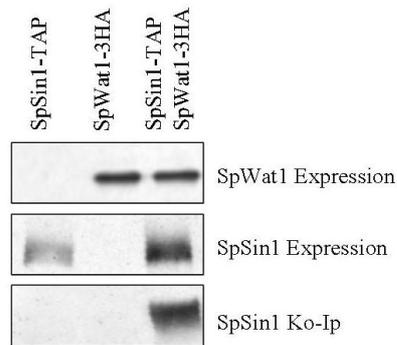


Abbildung 5.13: Ko-Immünpräzipitation von SpSin1 und SpWat1. Rohextrakte der Zellen, die *sin1*⁺-TAP (SPGC15-2B), *wat1*⁺-3HA (SPGC7-1C) oder *sin1*⁺-TAP und *wat1*⁺-3HA (SPGC16-2B) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1 mg (Expressionskontrollen SpSin1-TAP) bzw. 7,5 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 μ l IgG-beads bzw. 1 μ l anti-HA (30 min) und 20 μ l Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:10.000) eingesetzt. Als SpWat1-3HA Expressionskontrollen sind 15 μ g Rohextrakte aufgetragen worden. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.14 Interaktion von SpSte20 und SpWat1

Die Stämme, die entweder SpSte20-3HA, SpWat1-TAP oder beide Fusionsproteine herstellen, wurden für die Ko-Immünpräzipitationen verwendet. In Abbildung 5.13 sind die Kontrollen für die Produktion dieser Proteine gezeigt. Das Signal von SpSte20-3HA bei der Ko-Immünpräzipitation lässt auf eine Bindung von SpSte20-3HA an SpWat1-TAP schließen.

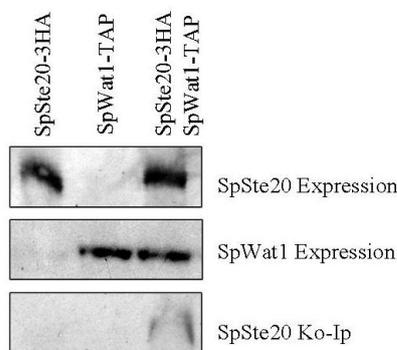


Abbildung 5.14: Ko-Immünpräzipitation von SpSin1 und SpWat1. Rohextrakte der Zellen, die *ste20*⁺-3HA (SPGC8-3A), *wat1*⁺-TAP (SPGC9-2C) oder *ste20*-3HA⁺-TAP und *wat1*⁺-TAP (SPGC11-1B) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 2 mg (Expressionskontrollen SpSte20-3HA) bzw. 7,5 mg (Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20 μ l IgG-beads bzw. 1 μ l anti-HA (30 min) und 20 μ l Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:10.000) eingesetzt. Als SpWat1-TAP Expressionskontrollen sind 10 μ g Rohextrakte aufgetragen worden. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.15 Keine Interaktion von SpTor1 und Sp Mip1

Es wurden Ko-Immünpräzipitationen mit Stämmen durchgeführt, die entweder Sp3HA-Tor1, SpMip1-TAP oder Sp3HA-Tor1 und SpMip1-TAP produzieren. Die Kontrollen, dass diese Fusionsproteine jeweils produziert werden, sind in Abbildung 5.15 zu sehen. Da Sp3HA-Tor1 nicht ko-immünpräzipitiert werden konnte, handelt es sich bei den untersuchten Proteinen nicht um Interaktionspartner.

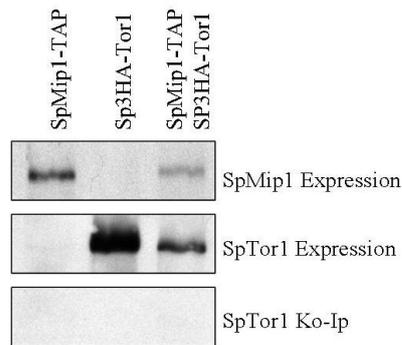


Abbildung 5.15: Keine Ko-Immunpräzipitation von SpTor1 und SpMip1. Rohextrakte der Zellen, die *3HA-tor1*⁺ (SPGC34-1B), *mip11*⁺-TAP (SPGC2-3A) oder *3HA-tor1*⁺-TAP und *mip1*⁺-TAP (SPGC31-7A) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 1mg (Expressionskontrollen SpMip1-TAP), 7,5 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor1) bzw. 15 mg (Ko-Immunpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 20µl IgG-beads bzw. 3 µl anti-HA (30 min) und 30 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Die Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.1.2.16 Existenz eines TOR-Komplex 2

Es konnten Interaktionen zwischen diesen Proteinen nachgewiesen werden: SpTor1 und SpSin1 (Abbildung 5.9); SpTor1 und SpSte20 (Abbildung 5.10); SpTor1 und SpWat1 (Abbildung 5.11), SpSin1 und SpSte20 (Abbildung 5.12); SpWat1 und SpSin1 (Abbildung 5.13) und SpWat1 und SpSte20 (Abbildung 5.14). Bei den folgenden Proteinen handelt es sich nicht um Interaktionspartner: SpTor1 und SpMip1 (Abbildung 5.15), SpMip1 und SpSte20 (Abbildung 5.6); SpMip1 und SpSin1 (Abbildung 5.7). Diese Daten sind in Abbildung 5.16 schematisch dargestellt und weisen auf die Existenz eines TOR-Komplex 2 hin.

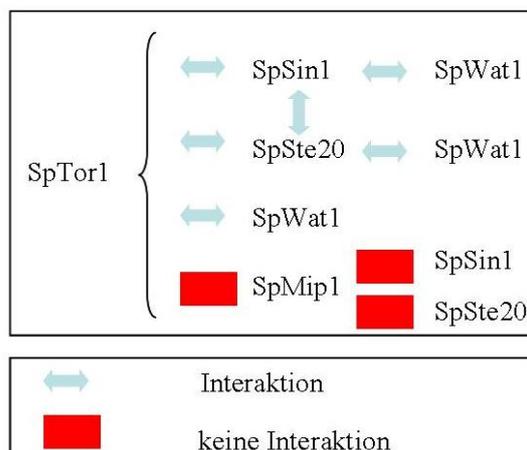


Abbildung 5.16: Zusammenfassung der Ko-Immunpräzipitationen.

5.1.3 Phänotyp von TOR-Komplex-Mutanten

Eine genetische Analyse der Mutanten, in denen die entsprechenden Gene der TOR-Komplex-Proteine deletiert waren, sollten die biochemischen Untersuchungen ergänzen und untermauern.

5.1.3.1 Phänotypen von TOR-Komplex 1 Deletionsmutanten

Da sowohl SpMip1, als auch SpTor2 essentielle Proteine sind, konnten keine Mutanten hergestellt werden, in denen *mip1*⁺ bzw. *tor2*⁺ deletiert vorlagen (Shinozaki-Yabana *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 2001; Weisman und Choder, 2001).

5.1.3.2 Phänotypen von TOR-Komplex 2 Deletionsmutanten

Es war bereits bekannt, dass SpTor1 in *S. pombe* die Antwort auf bestimmte oxidative bzw. osmotische Stressbedingungen vermittelt (Kawai *et al.*, 2001; Weisman und Choder, 2001). Inwieweit die anderen Mitglieder des TOR-Komplex 2 dabei auch eine Rolle spielen, sollte im Folgenden untersucht werden. Es wurden Stämme verwendet, bei denen entweder *tor1*⁺, *sin1*⁺ oder *ste20*⁺ deletiert waren. Ein *Δtsc1*-Stamm und der Wildtyp wurden als Kontrollen mitgeführt. Bei den Tropftests wurden den Nähragarplatten verschiedene Substanzen zugesetzt, die bestimmte Stressbedingungen für *S. pombe*-Zellen darstellen. Durch die Zugabe von H₂O₂ wird in der Zelle oxidativer Stress ausgelöst, während bestimmte Konzentrationen CaCl₂, NaCl und KCl osmotischem Stress auslösen. Desweiteren wurde das Purin-Analogon Koffein eingesetzt, dessen Wirkweise in *S. pombe* noch nicht vollständig geklärt ist. Bisher gibt es Hinweise darauf, dass durch Koffein bestimmte Kontrollpunkte (S-M; G2-M) des Zellzyklus übergangen werden (Moser *et al.*, 2000). Die Substanz Ethionin stellt ein Aminosäureanalogon dar. Während die Wirkung in *S. pombe* unbekannt ist, weiß man, dass es in *S. cerevisiae* bei der Translation anstelle von Methionin in die Proteine eingebaut wird und so seine toxische Wirkung ausübt (Sorsoli *et al.*, 1964). Auf dieselbe Weise wirkt das Arginin-Analogon Canavanin toxisch (Grenson *et al.*, 1968). In Abbildung 5.17 sind die Auswirkungen dieser Substanzen auf das Wachstum der Deletionsmutanten zu sehen. Es fällt auf, dass die Zellen, denen ein funktionelles Mitglied des TOR-Komplex 2 fehlt, bereits auf den Kontrollplatten (YE; EMM NH₄Cl; EMM Glutaminsäure) deutlich schlechter wachsen als der Wildtyp (972) oder die *Δtsc1*-Mutante. Bei osmotischem Stress (0,4 M KCl; 0,2 M NaCl; 0,02 M CaCl₂) wird der Phänotyp dieser Mutanten, besonders deutlich bei den CaCl₂-Platten, verstärkt. Ein geringfügig schlechteres Wachstum ist unter oxidativem Stress (1 mM H₂O₂) oder bei Zugabe von 10 mM Koffein oder Ethionin (30 µg/ml) zu verzeichnen. Ein mit

den Kontrollplatten vergleichbar gutes Wachstum kann bei 5 mM Koffein oder nach Canavanin-Zugabe (70 µg/ml) beobachtet werden. Auffällig ist, dass die TOR-Komplex 2-Mutanten bei allen gewählten Bedingungen jeweils einen ähnlichen Phänotyp zeigen. Daher ist zu vermuten, dass die entsprechenden Proteine eine gleiche bzw. ähnliche Funktion in der Zelle ausüben.

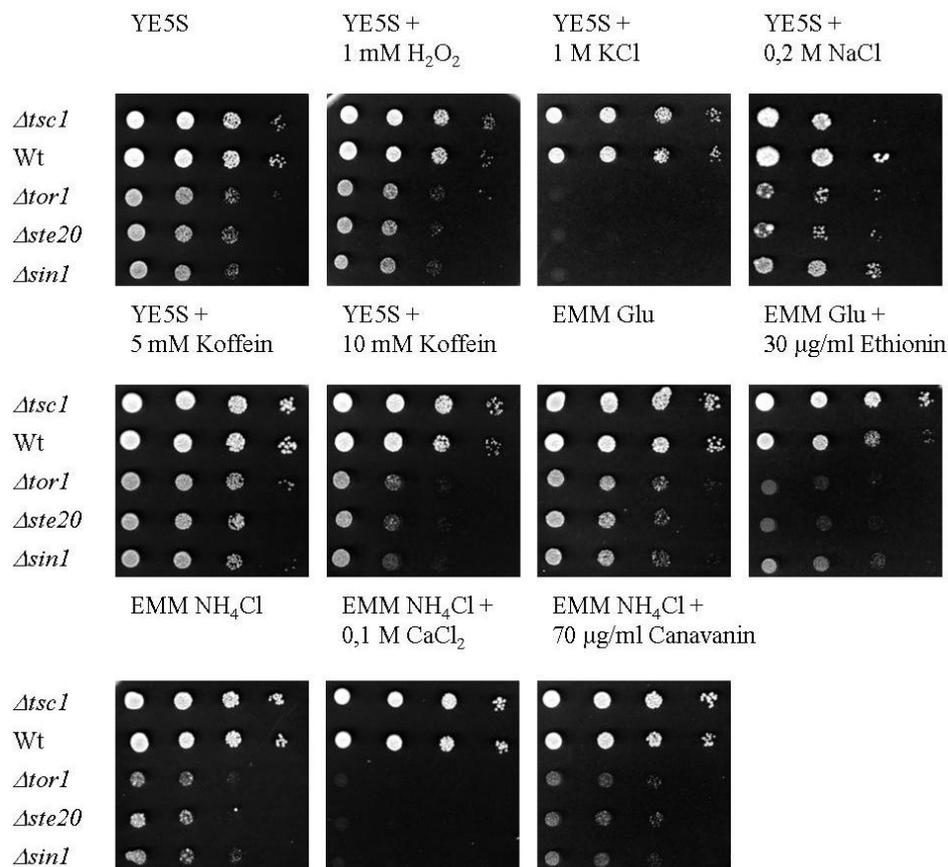


Abbildung 5.17: Phänotypische Analysen von *Ator1*-, *Aste20*- und *Asin1*-Mutanten. Es wurden die Stämme *Δtsc1* (SPAD22), Wt (972), *Δtor1* (SPAD93-T1A), *Δste20* (SPAD91-T16) und *Δsin1* (SPAD97-1A) untersucht.

5.1.4 Komplementationsanalysen von TOR-Komplex-Mitgliedern aus *S. cerevisiae* und *S. pombe*

In Tabelle 5. 1 sind die homologen Proteine aus Säugern, *S. cerevisiae* und *S. pombe* gegenübergestellt. Um die Konservierung der Mitglieder der TOR-Komplexe in *S. pombe* zu untersuchen, wurden Komplementationstests durchgeführt. Dabei wurde getestet, ob ein TOR-Komplex-Protein aus *S. pombe* in der Lage ist, den Phänotyp einer *S. cerevisiae*-Mutante, in der das homologe Protein nicht mehr produziert wird, zu komplementieren.

5.1.4.1 Keine Komplementation eines *GAL_{prom}-KOG1*-Stammes durch *mip1*⁺ unter reprimierenden Bedingungen

ScKOG1 ist essentiell für das Wachstum der Zellen (Loewith *et al.*, 2002). Es wurde untersucht, ob ScKOG1 aus *S. cerevisiae* durch SpMip1 aus *S. pombe* funktionell ersetzt werden kann. Dafür wurde ein *S. cerevisiae* Stamm verwendet, in dem die Expression von *KOG1* unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierten Promotors stand. Dieser wurde zum Einen mit einem Plasmid transformiert, welches für *KOG1* kodiert (Positivkontrolle). Zum Anderen wurde dieser Stamm mit dem Leervektor verwendet (Negativkontrolle). Um eine mögliche Komplementation zu analysieren, wurde der Stamm ebenfalls mit einem Plasmid transformiert, welches *mip1*⁺ exprimiert. In Abbildung 5.18 zeigen sich sowohl bei den Kontrollen als auch bei der Expression von *mip1*⁺ auf YNB mit Galaktose als Kohlenstoffquelle, also unter induzierenden Bedingungen, ein vergleichbar gutes Wachstum. Wenn der *GAL*-Promotor ausgeschaltet ist, kann durch die Expression von *mip1*⁺ der Wachstumsdefekt des verwendeten Stammes nicht aufgehoben werden. Somit liegt keine Komplementation von eines *GAL_{prom}-KOG1*-Stammes durch *mip1*⁺ vor. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei Tropftests erhalten, bei denen *mip1*⁺ in einen „multicopy“-Vektor vorlag.

GAL_{prom}-KOG1

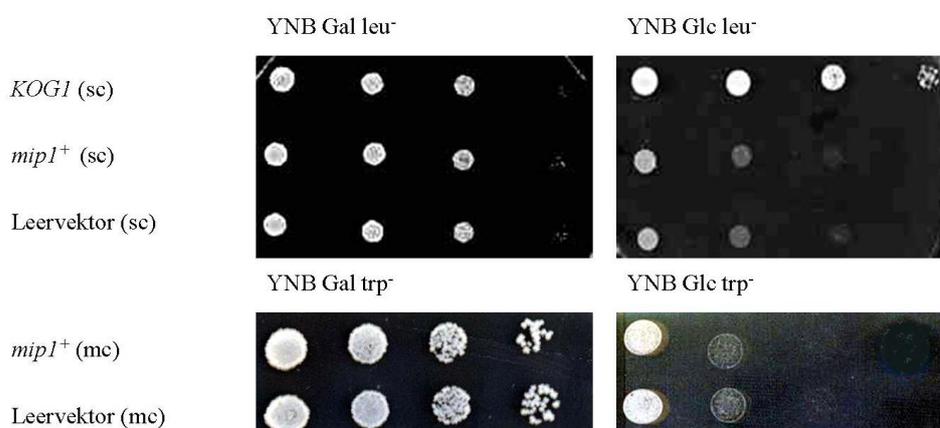


Abbildung 5.18: Komplementationsstudie eines *GAL_{prom}-KOG1*-Stammes durch *mip1*⁺. Der *S. cerevisiae* Stamm, der *GAL_{prom}-KOG1* exprimiert (RL93a) wurde einem sc-Leervektor (YCplac111), einem mc-Leervektor (YEplac112), einem sc-Plasmid, welches *KOG1* exprimiert (pAN46), einem sc-Plasmid welches *mip1*⁺ exprimiert (pGC3) oder einem mc-Plasmid, welches *mip1*⁺ exprimiert (pGC19) transformiert.

5.1.4.2 Keine Komplementation eines *GALI_{prom}-AVO1*-Stammes durch *sin1*⁺ unter reprimierenden Bedingungen

Das Protein SpSin1 aus *S. pombe* stellt das Homologon zu ScAVO1 aus *S. cerevisiae* dar. Im Folgenden wurde überprüft, ob *sin1*⁺ den Wachstumsdefekt eines Stammes, der kein ScAVO1 produziert, komplementieren kann (Loewith *et al.*, 2002). Es wurde ein Stamm ausgewählt, bei dem die Expression von *AVO1* unter der Kontrolle eines *GALI*-Promoters stand. Dieser wurde mit dem Leervektor (Negativkontrolle) oder mit Plasmiden transformiert, die entweder für *AVO1* (Positivkontrolle) oder *sin1*⁺ (zu testender Stamm) kodierten. Auf Nährmedium mit Galaktose wachsen alle verwendeten Stämme vergleichbar gut (Abbildung 5.19). In Abwesenheit von Galaktose zeigt sich bei der Expression von *sin1*⁺ ein geringes Wachstum. Auch ein Umklonieren von *sin1*⁺ in einen „multicopy“-Vektor ergab nach Transformation in *GALI_{prom}-AVO1*-Zellen den gleichen Phänotyp. Demzufolge ist *sin1*⁺ hier nicht in der Lage, den Wachstumsdefekt eines *GALI_{prom}-AVO1*-Stammes unter reprimierenden Bedingungen aufzuheben.

GALI_{prom}-AVO1

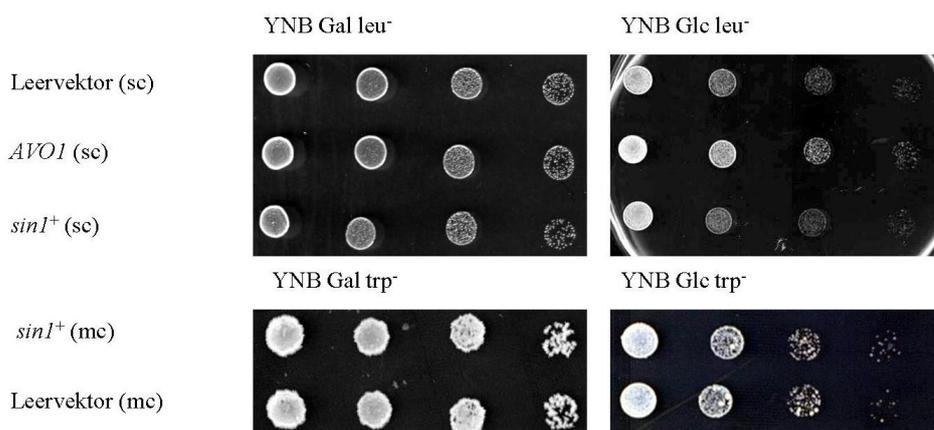


Abbildung 5.19: Komplementationsstudie eines *GALI_{prom}-AVO1*-Stammes durch *sin1*⁺. Der *S. cerevisiae* Stamm, der *GALI_{prom}-AVO1* exprimiert (RL23-1C) wurde einem sc-Leervektor (YCplac111), einem mc-Leervektor (YEplac112), einem sc-Plasmid, welches *AVO1* exprimiert (pGC15), einem sc-Plasmid, welches *sin1*⁺ exprimiert (pGC16) oder einem mc-Plasmid, welches *sin1*⁺ exprimiert (pGC20) transformiert.

5.1.4.3 Keine Komplementation eines *GALI_{prom}-AVO3*-Stammes durch *ste20*⁺ unter reprimierenden Bedingungen

ScAVO3 ist ein essentielles Protein (Loewith *et al.*, 2002). Ob ScAVO3 aus *S. cerevisiae* von SpSte20 aus *S. pombe* ersetzt werden kann, wurde im Folgenden geklärt. Aufgrund eines

vorgeschalteten *GALI*-Promotors findet in dem verwendeten Stamm eine Expression von *AVO3* nur in Anwesenheit von Galaktose statt. Für den Komplementationstest wurde der Stamm sowohl mit einem Leervektor (Negativkontrolle), als auch mit einem Vektor, der für *AVO3* kodiert (Positivkontrolle) und mit einem Vektor, der die Zellen zur Expression von *ste20*⁺ befähigt, transformiert. Unter induzierten Bedingungen (YNB Galaktose) zeigen die Stämme ein vergleichbar gutes Wachstum (Abbildung 5.20). Auf YNB Glukose zeigen die Zellen, die *ste20*⁺ exprimieren, ein ähnlich schwaches Wachstum wie die Negativkontrolle. Die Expression von *ste20*⁺ kann den Wachstumsdefekt eines *GALI*_{prom}-*AVO3*-Stammes unter reprimierenden Bedingungen daher nicht unterdrücken. Dieses Ergebnis zeigte sich auch, wenn *ste20*⁺ auf einem „multicopy“-Vektor exprimiert wurde.

*GALI*_{prom}-*AVO3*

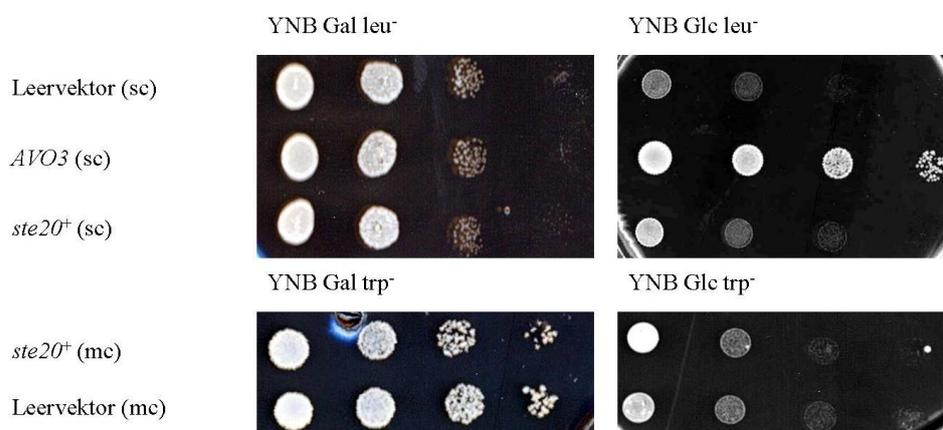


Abbildung 5.20: Komplementationsstudie eines *GALI*_{prom}-*AVO3*-Stammes durch *ste20*⁺. Der *S. cerevisiae* Stamm, der *GALI*_{prom}-*AVO3* exprimiert (SW53-1B) wurde einem sc-Leervektor (YCplac111), einem mc-Leervektor (YEplac112), einem sc-Plasmid, welches *AVO3* exprimiert (pGC17), einem sc-Plasmid welches *ste20*⁺ exprimiert (pGC18) oder einem mc-Plasmid, welches *ste20*⁺ exprimiert (pGC21) transformiert.

5.1.4.4 Komplementation eines *GALI*_{prom}-*LST8*-Stammes durch *wat1*⁺ unter reprimierenden Bedingungen

In *S. cerevisiae* ist ScLST8 ein essentielles Protein (Roberg *et al.*, 1997). Um herauszufinden, ob ScLST8 durch das *S. pombe* Homologe SpWat1 ersetzt werden kann, wurde ein Stamm, bei dem die Expression von *LST8* durch Galaktose induziert wird, mit folgenden Plasmiden transformiert: Es wurde ein Leervektor (Negativkontrolle), ein Plasmid, welches für *LST8* kodiert (Positivkontrolle) und ein Plasmid, welches *wat1*⁺ exprimiert, verwendet. War Galaktose als Kohlenstoffquelle vorhanden, wiesen alle Stämme ein vergleichbar gutes Wachstum auf (Abbildung 5.21A). Unter den *GALI*-Promoter reprimierenden Bedingungen

(YNB Glukose) konnten die *wat1*⁺-exprimierenden Zellen ebenso gut wie die Postivkontrolle wachsen. Diese Beobachtungen weisen eine Komplementation des *GALI_{prom}-LST8*-Stammes durch *wat1*⁺ nach. Um diese Beobachtung zu bestätigen, wurde ein weiterer Stamm untersucht. Bei diesem Stamm ist *LST8* deletiert und die Zellen bleiben durch die extrachromosomale Expression von *LST8* durch ein Plasmid lebensfähig. Dieses Plasmid besitzt das Gen *URA3*, welches für die Orotidin-5-phoshat-Decarboxylase kodiert. Somit sind die Zellen, die dieses Plasmid tragen zur Pyrimidin-Synthese fähig. Ist allerdings 5'-Fluororotsäure (FoA) im Medium vorhanden, wird dieses aufgenommen und durch diese Decarboxylase in toxisches 5'-Fluorouracil umgewandelt. Auf diese Weise können die Transformanten selektiert werden, die nicht mehr das Plasmid mit *LST8* tragen, aber durch die Aufnahme der Plasmide, die entweder *LST8* (Postitivkontrolle) oder *wat1*⁺ exprimieren, wachsen können. Letzteres wäre nur der Fall, wenn die Expression von *wat1*⁺ den Wachstumsdefekt durch die *lst8*-Deletion aufheben könnte. Abbildung 5.21B zeigt ein vergleichbares Wachstum von der Positivkontrolle und den *wat1*⁺-exprimierenden Zellen. Somit bestätigt diese Analyse eine Komplementation der $\Delta lst8$ -Mutanten durch *wat1*⁺.

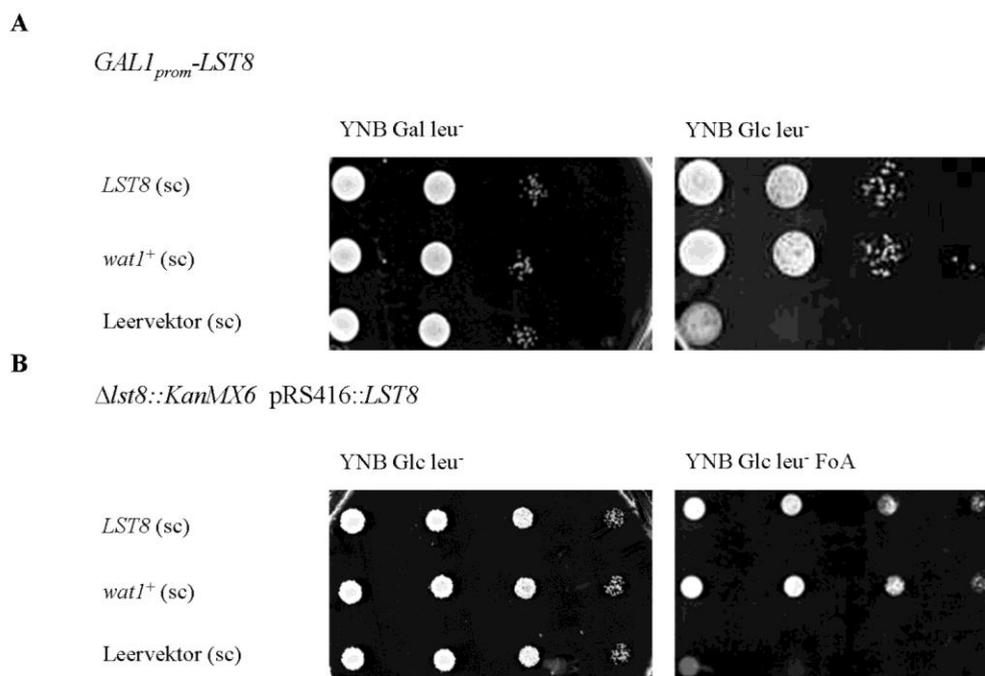


Abbildung 5.21: Komplementationsstudie eines *GALI_{prom}-LST8*-Stammes durch *wat1*⁺. **A:** Der *S. cerevisiae* Stamm, der *GALI_{prom}-LST8* exprimiert (RL57-2D) wurde einem sc-Leervektor (YCplac111), einem sc-Plasmid, welches *LST8* exprimiert (YCplac111::*LST8*) oder einem sc-Plasmid welches *wat1*⁺ exprimiert (pGC13) transformiert. **B:** Es wurde ein *S. cerevisiae* Stamm verwendet, bei dem das Gen *LST8* deletiert ist und ein Plasmid trägt, welches *LST8* exprimiert (AN160-1A: $\Delta lst8::KanMX6$ pRS416::*LST8*). Dieser wurde entweder mit einem Leervektor (YCplac111), mit einem anderen sc-Plasmid, welches *LST8* exprimiert (YCplac111::*LST8*) oder mit einem sc-Plasmid, das *wat1*⁺ exprimiert (pGC13) transformiert.

5.2 Einfluss von Rapamycin auf den TOR-Signalweg in *S. pombe*

Es ist bekannt, dass Rapamycin das vegetative Wachstum von *S. pombe* nicht hemmt, wie es in *S. cerevisiae* der Fall ist (Heitmann *et al.*, 1991; Koltin *et al.*, 1991; Weisman *et al.*, 1997). Jedoch werden in der Spalthefe die sexuelle Entwicklung und die SpTor1-abhängige Leucin-Aufnahme durch Rapamycin inhibiert (Weisman *et al.*, 1997; Weisman *et al.*, 2005). Um mehr über die Wirkung von Rapamycin in *S. pombe* zu erfahren, wurden die folgenden Untersuchungen vorgenommen.

5.2.1 Interaktion von SpFkh1 und SpTor1/2

Das Protein SpFkh1 stellt das homologe Protein zu FKBP12 aus Säugern dar, welches mit Rapamycin einen Komplex bildet, bevor dieser anschließend an die FRB-Domäne der TOR-Proteine bindet (Helliwell *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1996). Es ist unklar, ob Rapamycin auch in *S. pombe* als SpFkh1-Rapamycin-Komplex an die FRB-Domänen von SpTor1 und/oder SpTor2 bindet, da das vegetative Wachstum in diesem Organismus nicht gehemmt wird (Weisman *et al.*, 1997). In einem Zwei-Hybrid-System wurde eine Interaktion der FRB-Domäne von SpTor1 und SpFkh1 in Anwesenheit von Rapamycin beobachtet (Weisman *et al.*, 2005). In dieser Arbeit sollten mögliche Interaktionen von SpFkh1 und den TOR-Proteinen *in vivo* mittels Ko-Immünpräzipitationen überprüft werden.

5.2.1.1 Interaktion von SpFkh1 und SpTor1

Stämme, die *fkh1*⁺-TAP, *3HA-tor1*⁺, oder *fkh1*⁺-TAP und *tor1*⁺-3HA exprimieren, wurden in Vollmedium angezogen. Bei einer OD_{600nm} von 0,8 erfolgte die Zugabe von 100 ng/ml Rapamycin für 1h. In Abbildung 5.22 sind die Western Blots der Ko-Immünpräzipitationen dargestellt. Der linke Blot zeigt die Proben ohne Zugabe von Rapamycin-Zugabe, während der rechte Blot die Immünpräzipitationen in Anwesenheit von Rapamycin darstellt. Die Expressionskontrollen von SpFkh1 und SpTor1 sind jeweils vorhanden. Deutlich zu erkennen ist ein Signal der Ko-Immünpräzipitation in Anwesenheit von Rapamycin, während in Abwesenheit von Rapamycin kein ko-immünpräzipitiertes SpTor1 detektiert werden konnte. Somit scheinen SpFkh1 und Sp3HA-Tor1 nur in Anwesenheit von Rapamycin zu interagieren.

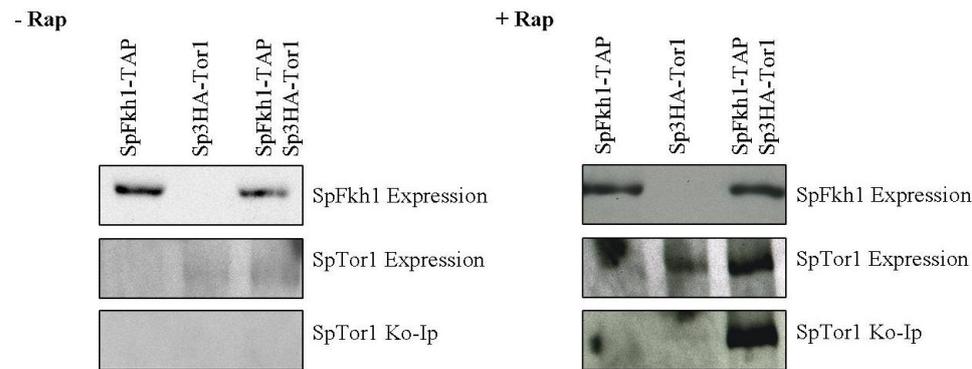


Abbildung 5.22: Ko-Immünpräzipitation von SpFkh1 und SpTor1 in Abhängigkeit von Rapamycin. Für eine Behandlung mit Rapamycin wurde den Zellen 100 ng/ml Rapamycin (gelöst in 90 % Ethanol + 10 % Tween) zugegeben. Bei den Zellen ohne Rapamycin-Behandlung erfolgte die Zugabe von 90 % Ethanol + 10 %. Nach jeweils 1 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Rohextrakte der Zellen, die *fkh1*⁺-TAP (SPAD11-3B), *3HA-tor1*⁺ (SPGC34-1B) oder *fkh11*⁺-TAP und *3HA-tor1*⁺ (SPGC39-1D) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 15 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor1 und Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 3 µl anti-HA (30 min) und 20 µl Protein G-Sepharose bei 4°C (2 h). Zur Kontrolle von SpFkh1-TAP wurden 3,4 µg Rohextrakt aufgetragen. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-protein A (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

5.2.1.2 Interaktion von SpFkh1 und SpTor2

Die Ko-Immünpräzipitation wurde mit einem Stamm durchgeführt, der *fkh1*⁺-13myc und *tor2*⁺-3HA exprimierte. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 in Minimalmedium – EMM ohne Aminosäuren- (Abbildung 5.23 linker Western Blot „MM“) oder Vollmedium – YE5S+D- (Abbildung 5.23 rechter Western Blot „VM“) angezogen und 1 h in An- oder Abwesenheit von Rapamycin inkubiert. Die Kontrollen für die Produktion der Fusionsproteine SpFkh1-13myc und SpTor2-3HA sind jeweils vorhanden. Ein, auf eine Interaktion von SpFkh1 und SpTor2 deutendes Signal, konnte nur in Anwesenheit von Rapamycin detektiert werden. Dieses war sowohl für die Kultur in Vollmedium, als auch in Minimalmedium zu beobachten.

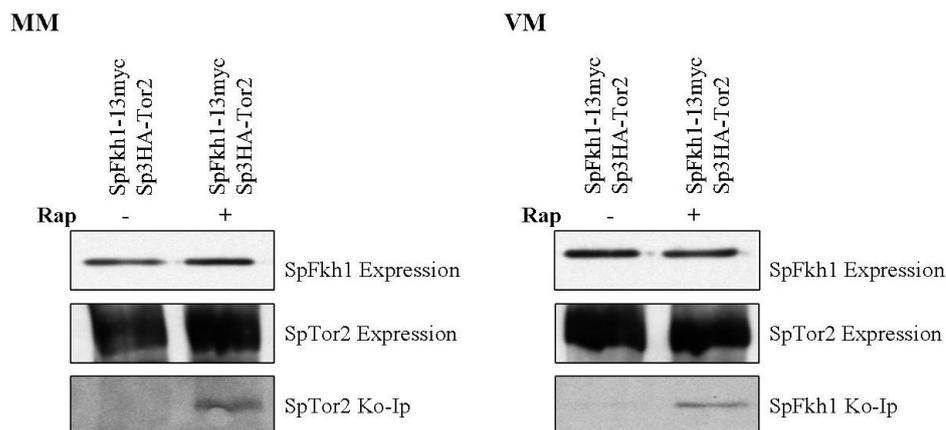


Abbildung 5.23: Ko-Immünpräzipitation von SpFkh1 und SpTor2 in Abhängigkeit von Rapamycin. Für eine Behandlung mit Rapamycin wurde den Zellen 100 ng/ml Rapamycin (gelöst in 90 % Ethanol + 10 % Tween) zugegeben. Bei den Zellen ohne Rapamycin-Behandlung erfolgte die Zugabe von 90 % Ethanol + 10 %. Nach jeweils 1 h Inkubation wurden die Zellen geerntet. Rohextrakte der Zellen, die *fkh1⁺-13myc* und *3HA-tor2⁺* (SPGC37-1D) exprimieren, wurden Immunpräzipitationen unterzogen. Es wurden 15 mg (Expressionskontrollen Sp3HA-Tor1 und Ko-Immünpräzipitation) Gesamtprotein eingesetzt. Die Präzipitationen erfolgten mit 3 μ l anti-HA (30 min) und 20 μ l Protein G-Sepharose bei 4°C (2 h). Zur Kontrolle von SpFkh1-TAP wurden 3,4 μ g Rohextrakt aufgetragen. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-myc (1:10.000) bzw. anti-HA (1:2.000) eingesetzt. Proteinbanden wurden mittels Chemilumineszenz detektiert.

MM: Minimalmedium; VM: Vollmedium

5.2.2 Phänotypische Untersuchungen von TOR-Komplex 2-Deletionsmutanten in Anwesenheit von Rapamycin

In Abbildung 5.24 sind Wachstumsanalysen von TOR-Komplex 2-Deletionsmutanten unter verschiedenen Stressbedingungen in An- oder Abwesenheit von Rapamycin gezeigt. Als Stämme wurden *Δtor1*, *Δste20* und *Δsin1* analysiert. Als Kontrollstämme dienten *Δtsc1* und der Wildtyp. Übereinstimmend mit vorherigen Publikationen wird das Wachstum von *S. pombe* Wildtyp-Zellen durch die Zugabe von Rapamycin nicht beeinträchtigt (Weisman, 1997; Abbildung 5.24 YE5S/ YE5S + 100 ng/ml Rapamycin). Wie bereits in Abbildung 5.17 zu sehen, sind die TOR-Komplex 2-Mutanten sensitiver als der Wildtyp gegenüber bestimmten Stressbedingungen. Diese Mutanten weisen bei NaCl-Stress ein deutlich schwächeres Wachstum auf, wenn Rapamycin im Medium vorhanden war. Das Wachstum wurde ebenfalls geringfügig geschwächt, wenn Rapamycin und 1 mM H₂O₂ bzw. 5 mM oder 10 mM Koffein zugegeben wurden. Ein Wachstumsdefekt zeigt sich bei Minimalmedium mit Glutaminsäure durch die Zugabe von Rapamycin (EMM Glu + Rapamycin). Bei Minimalmedium mit Ammoniumchlorid ist hingegen ein nahezu vergleichbar gutes

Wachstum wie bei der Platte ohne Rapamycin zu beobachten (EMM NH_4Cl + Rapamycin). Das Wachstum wird durch die Zugabe von Canavanin oder Ethionin und Rapamycin kaum vermindert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TOR-Komplex 2 Mutanten Rapamycin-sensitiv sind. Der dabei beobachtete Wachstumsdefekt wurde durch bestimmte, vor allem osmotische, Stressbedingungen verstärkt.

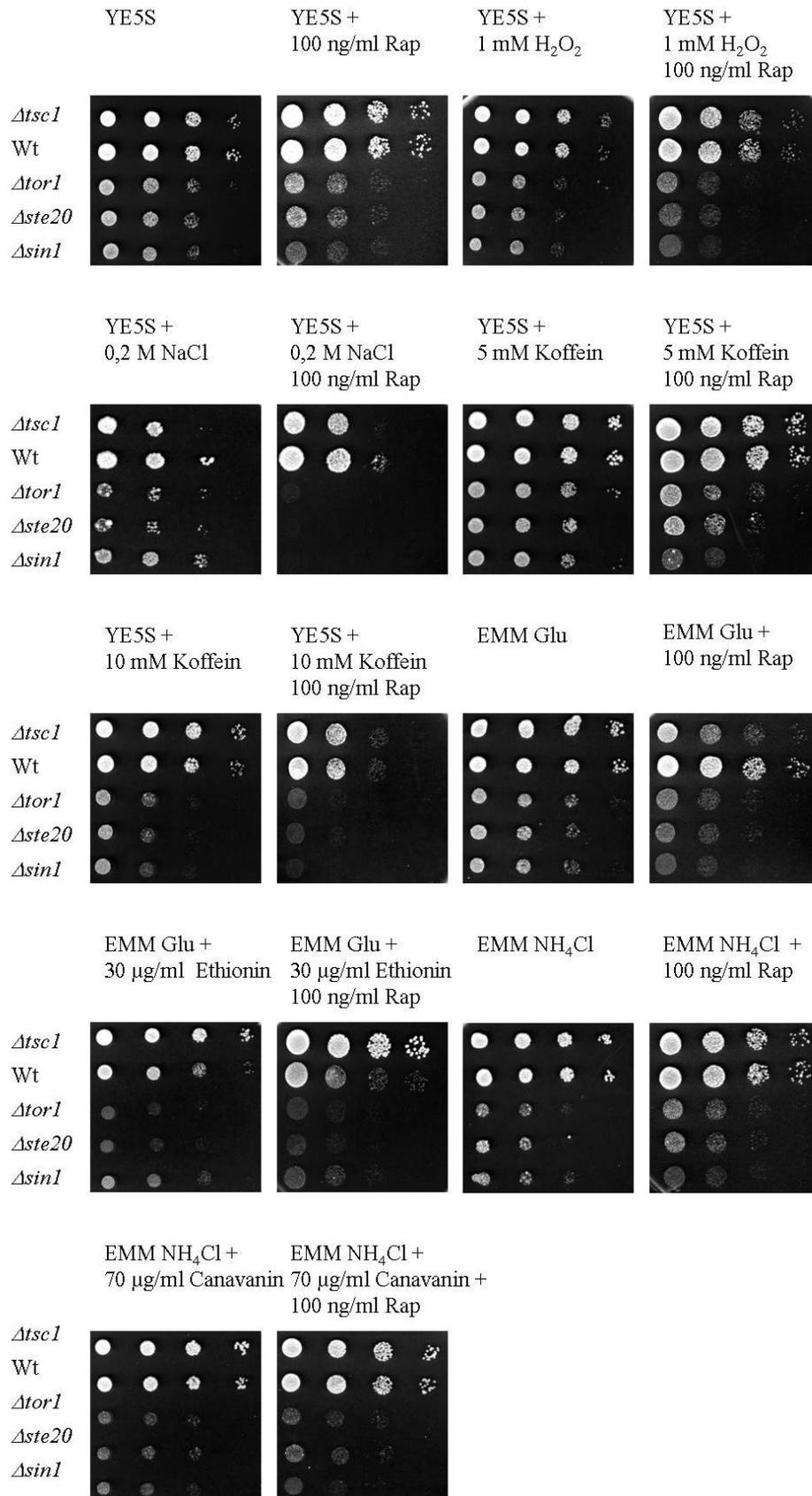


Abbildung 5.24: Phänotypische Analysen von *Ator1*-, *Aste20*- und *Asin1*-Mutanten. Es wurden die Stämme *Δtsc1* (SPAD22), Wt (972), *Δtor1* (SPAD93-T1A), *Δste20* (SPAD91-T16) und *Δsin1* (SPAD97-1A) untersucht.

5.2.3 Rapamycin-Sensitivität bei der Überexpression von *tor1*⁺ und *tor2*⁺

Um die Funktion von SpTor1 und SpTor2 weiter zu analysieren, wurde ein Stamm hergestellt, in dem der natürliche Promotor von *tor1*⁺ durch den *nmt1*-Promotor ersetzt wurde. Dieser ermöglicht zum Einen eine gezielte Induktion der *tor1*⁺ Expression und zum Anderen eine Überexpression dieses Gens. Desweiteren wurde ein Stamm verwendet, der in der Lage war, *tor2*⁺ zu überexprimieren. Um die Auswirkungen einer solchen Überexpression von *tor1*⁺ und *tor2*⁺ zu untersuchen, wurde der Phänotyp durch Tropftests untersucht (Abbildung 5.25). Zusätzlich wurden neben dem Wildtyp auch eine Δ *tor1*-Deletionsmutante und eine temperatursensitive *tor2*-Mutante verwendet. Wie bereits beschrieben, ist der Δ *tor1*-Stamm sensitiv gegenüber bestimmten Stressbedingungen, wie z. B. bei KCl oder H₂O₂-Zugabe (Kawai *et al.*, 2001; Weisman und Choder, 2001, diese Arbeit: Abbildung 5.17). Dies wird durch die Zugabe von Rapamycin zum Teil verstärkt (Abbildung 5.25), wie in Anwesenheit von KCl, NaCl, CaCl₂ oder H₂O₂ -unabhängig von der Thiaminkonzentration- zu beobachten ist. Ist Thiamin im Medium vorhanden, und somit der *nmt1*-Promoter nicht angeschaltet, wächst der *nmt1-3HA-tor1*⁺-Stamm vergleichbar mit dem Wildtyp. In Abwesenheit von Thiamin wurde *tor1*⁺ überexprimiert, was zu einem schlechteren Wachstum der Zellen führte. Dieses verlangsamte Wachstum wurde durch die Zugabe von 100 ng/ml Rapamycin deutlich verstärkt. Es war kein Unterschied zwischen den Kontrollplatten (EMM NH₄Cl; EMM Glutaminsäure) und den gewählten Stressbedingungen (1mM H₂O₂, 0,4 M KCl; 0,2M NaCl; 0,02 M CaCl₂) festzustellen. Somit scheint sich dieser Phänotyp auf das generelle Wachstumsverhalten zu beschränken. Betrachtet man den Phänotyp von *nmt1-tor2*⁺ ist festzustellen, dass sich unter nahezu allen Bedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen induzierter und nicht-induzierter Expression oder An- und Abwesenheit zeigt. Lediglich bei Canavanin-Zugabe ist die bereits publizierte Resistenz gegenüber Canavanin (70 µg/ml) zu erkennen (Weisman *et al.*, 2007). Deutlich zu sehen ist die Rapamycin-Hypersensitivität des *tor2-ts* Stammes (Hayashi *et al.*, 2007). In Abbildung 5.25 sind Platten mit 0 mg/l und 5 mg/l Thiamin dargestellt. Es wurden jeweils auch Platten mit 2 mg/l getestet (Daten nicht gezeigt). Während sich sowohl bei den Kontrollstämmen als auch bei dem *nmt1-tor2*⁺-Stamm der Phänotyp nicht von dem bei den anderen Thiaminkonzentrationen unterschied, zeigte sich bei *nmt1-tor1*⁺ ein intermediärer Phänotyp zwischen nicht-induziertem Zustand und Überexpression (Daten nicht gezeigt). Dabei war ein besseres Wachstum als bei 0 mg/l Thiamin, jedoch ein schlechteres Wachstum als bei 5 mg/l Thiamin zu beobachten. Zusammenfassend lässt sich somit ein Rapamycin-sensitiver Phänotyp bei einer *tor1*⁺-Überexpression festhalten.

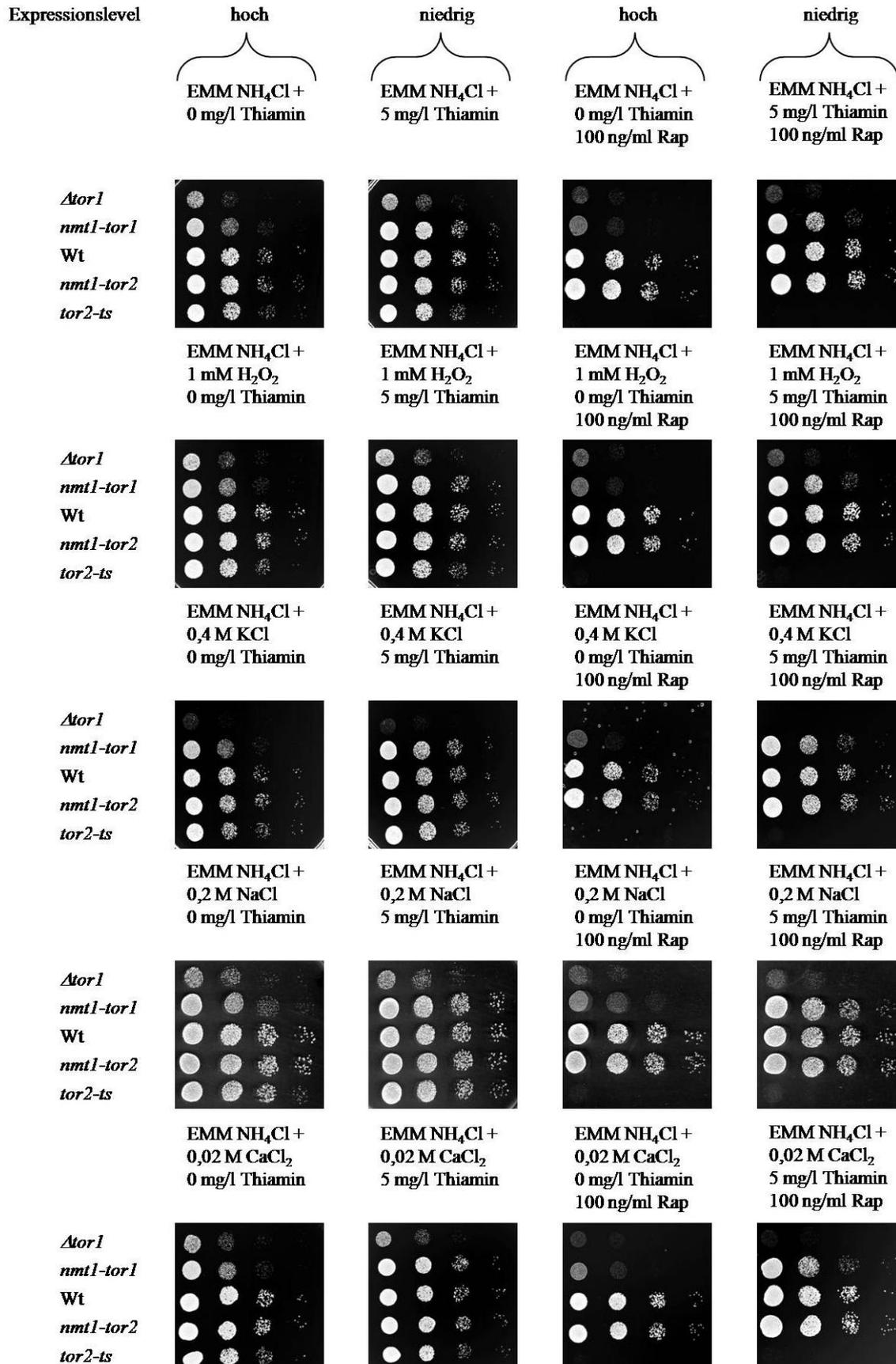


Abbildung 5.25: Phänotypische Analysen von Zellen, die *tor1*⁺ und *tor2*⁺ überexprimieren. Es wurden die Stämme *Δtor1* (SPAD93-T1A), *nmt1-3HA-tor1*⁺ (SPGC52-1A), Wt (972), *nmt1-3HA-tor2*⁺ (*S2015*) und *tor2-ts* (*SPKS68*) verwendet. Die Platten wurden bei Raumtemperatur inkubiert.

5.3 Einfluss von Rapamycin auf das TOR-Komplex 2-Zielprotein SpGad8

SpGad8 ist ein Effektorprotein von SpTor1, und wird durch SpTor1 an an S546 und S527 phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen sind, neben der Phosphorylierung durch SpKsg1 an T387, essentiell für die Aktivität von SpGad8 (Matsuo *et al.*, 2003). Durch die beobachtete Interaktion von SpFkh1 und SpTor1 in Anwesenheit von Rapamycin (Abbildung 5.22), stellt sich die Frage, ob Rapamycin bestimmte SpTor1-Funktionen, wie z.B. die Phosphorylierung von SpGad8, beeinflusst. Daher sollte im Folgenden geklärt werden, ob die Anwesenheit von Rapamycin den Phosphorylierungsstatus von SpGad8 verändert.

5.3.1 Phosphorylierungsstatus von SpGad8 in Abhängigkeit von Rapamycin

Im Folgenden wurde der Phosphorylierungsstatus von SpGad8 in Abhängigkeit von Rapamycin untersucht.

5.3.1.1 Nachweis der Phosphorylierung von SpGad8 durch Phospho-Serin-spezifische Antikörper

Es wurden Zellen, die *gad8⁺-TAP* exprimieren, wie in Kapitel 4.3.30 beschrieben, behandelt. In einem Western Blot wurde das Phosphorylierungslevel von SpGad8, zu verschiedenen Zeitpunkten vor (T_0) bzw. nach Rapamycin-Zugabe (T_{15} bis T_{120}), durch Verwendung eines anti-phospho-Serin-Antikörpers, nachgewiesen (Abbildung 5.26). Es zeigte sich kein Unterschied in der Intensität der Banden und somit kein veränderter Phosphorylierungszustand von SpGad8 zu den verschiedenen Zeitpunkten.

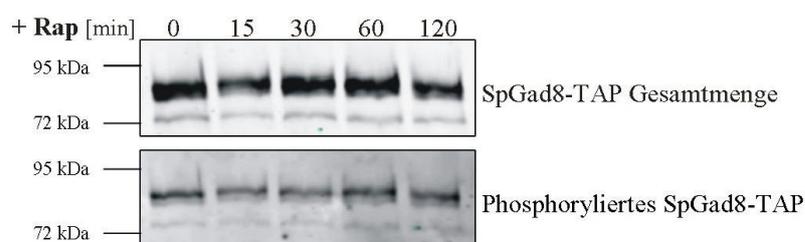


Abbildung 5.26: Der Phosphorylierungsstatus von SpGad8 nach Rapamycin-Behandlung. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Zugabe von 100 ng/ml Rapamycin wurden je 50 ml Zellkultur eines Stammes, der *gad8⁺-TAP* exprimiert (SPAL44-2A), entnommen. Es wurden 1 mg Gesamtprotein zur Immunpräzipitation mit IgG-beads eingesetzt. In Western-Blot-Analysen wurde das SpGad8-TAP sowohl durch den anti-phospho-Serin-Antikörper (1:2000), als auch anti-Protein A-Antikörper (1:10000) detektiert. Es wurde mit dem „Odyssey“-System gearbeitet.

5.3.1.2 Nachweis der Phosphorylierung von SpGad8 durch „Low-crosslinker“-SDS-Gele

Hier wurden ebenfalls Zellen, die SpGad8-TAP produzierten, verwendet und wie unter Kapitel 4.3.30 beschrieben, behandelt. Rohextrakte der Proben T₀ bis T₁₂₀ wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, welches einen sehr niedrigen Vernetzungsgrad (Acrylamid: Bisacrylamid 149:1) hatte. Dadurch sollte eine bessere Auftrennung der einzelnen Phosphorylierungszustände von SpGad8 erreicht werden. In Abbildung 5.27 sind keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Rapamycin-Zugabe zu erkennen.

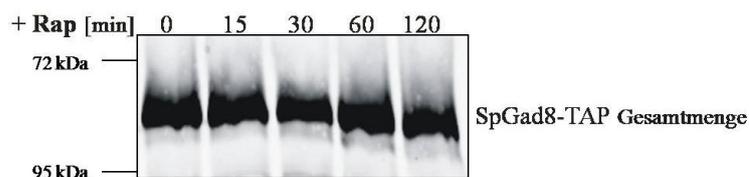


Abbildung 5.27: Der Phosphorylierungsstatus von SpGad8 nach Rapamycin-Behandlung. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Zugabe von 100 ng/ml Rapamycin wurden je 50 ml Zellkultur eines Stammes, der *gad8⁺-TAP* exprimiert (SPAL44-2A), entnommen. Es wurden 4 µg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel mit einem Acrylamid: Bisacrylamid-Verhältnis von 149:1 aufgetragen. In Western Blot-Analysen wurde als erster Antikörper anti-Protein A (1:10000) eingesetzt. Es wurde mit dem „Odyssey“-System gearbeitet.

5.3.1.3 Nachweis der Phosphorylierung von SpGad8 durch „Phostag“-Gele

Eine andere Möglichkeit, um eine Änderung des Phosphorylierungsstatus eines Proteins zu erkennen, ist die Verwendung von „Phostag“-Gelen. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls genutzt. Durch ein verändertes Laufverhalten der Proteine könnte man einen „Shift“ bei einer Änderung des Phosphorylierungszustandes beobachten. Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls ein SpGad8-TAP-produzierender Stamm verwendet, der wie in Kapitel 4.3.30 beschrieben behandelt wurde. Das „Phostag“-Gel in Abbildung 5.28 stellt die verschiedenen Zeitpunkte, vor und nach Rapamycin-Behandlung dar. Auch hier ist keine Veränderung des Phosphorylierungslevels von SpGad8 in Abhängigkeit von Rapamycin zu sehen. Auch eine dreistündige Inkubation mit Rapamycin zeigte kein anderes Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurden sowohl eine höhere Konzentration Rapamycin (200 ng/ml), als auch verschiedene Konzentrationen der „Phostag“-Lösung (30, 75 oder 100 µmol) getestet. Auch unter diesen Bedingungen wurden keine Änderungen des Phosphorylierungslevels von SpGad8 detektiert.

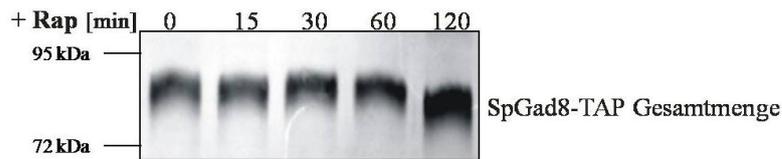


Abbildung 5.28: Der Phosphorylierungsstatus von SpGad8 nach Rapamycin-Behandlung. Zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der Zugabe von 100 ng/ml Rapamycin wurden je 50 ml Zellkultur eines Stammes, der *gad8⁺-TAP* exprimiert (SPAL44-2A), entnommen. Es wurden 4 µg Gesamtprotein auf ein 7,5 % 50 µmol „Phostag-Gel“ (Acrylamid: Bisacrylamid- Verhältnis 29:1) aufgetragen. Das Protein SpGad8-TAP wurde anschließend mit anti-Protein A (1:10000) als erstem Antikörper detektiert. Es wurde mit dem „Odyssey“-System gearbeitet.

5.3.2 Phänotypische Untersuchungen von *Δgad8*-Deletionsmutanten

Für diese Untersuchungen wurden *Δgad8*-Mutanten und als Kontrollen der Wildtyp und eine *Δtor1*-Mutante verwendet. Es wurde bereits publiziert, dass *Δgad8* Mutanten einen ähnlichen Phänotyp zeigen wie *Δtor1* Mutanten (Matsuo *et al.*, 2003). So zeigen sie ebenfalls eine geringe Paarungseffizienz und Defekte des G1-Arrest bei Stickstoffmangel. Außerdem sind sowohl *Δtor1*- als auch *Δgad8*-Mutanten sensitiv gegenüber Hitze oder KCl-Stress (Matsuo *et al.*, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ähnlicher Phänotyp der beiden Mutanten unter weiteren Stressbedingungen festgestellt. So zeigen diese jeweils ein deutlich geschwächtes Wachstum bei der Zugabe von H₂O₂, CaCl₂, Canavanin und Ethionin (Abbildung 5.29). Dieser Wachstumsdefekt wurde durch die Zugabe von 100 ng/ml Rapamycin unter folgenden Bedingungen weiter verstärkt: YE, EMM NH₄Cl, YE 3 mM H₂O₂ und YE 0,02 M CaCl₂. Keine bzw. nur ein schwach verändertes Wachstumsverhalten zeigte sich bei EMM Glutaminsäure-, EMM NH₄Cl +70 µg/ml Canavavin- und EMM Glutaminsäure +30 µg/ml Ethionin-Platten. Außer im Falle von 0,02 M CaCl₂ konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollplatten in Anwesenheit von Rapamycin und einer Stresssituation in Anwesenheit von Rapamycin ausgemacht werden. Somit kann man eher von einem generellen Wachstumsdefekt der *Δgad8*-Mutante bei der Zugabe von Rapamycin sprechen.

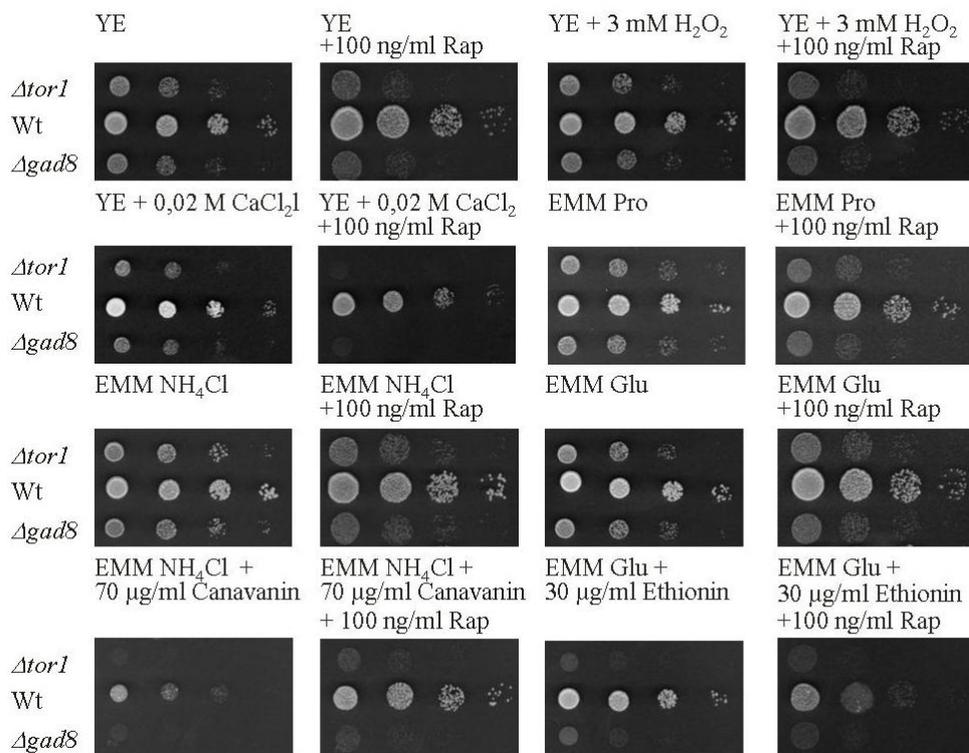


Abbildung 5.29: Phänotyp der *Agad8*-Mutanten in Abhängigkeit von Rapamycin. Es wurden die Stämme *Δtor1* (SPAD93-T1A), Wt (972) und *Δgad8* (SPGC41) verwendet.

5.4 Ist die Interaktion zwischen der leichten Kette des Clathrins und der TOR-Komplex 2-Komponente SpSte20/ ScAvo3/ mRictor konserviert?

Mittels des Zwei-Hybrid-Systems wurde das SpClc1 als neues Bindeprotein des TOR-Komplex 2 Proteins SpSte20 identifiziert (Anja Lorberg, persönliche Mitteilung). Das Protein SpClc1 stellt die leichte Kette des Clathrins dar und ist damit ein fundamentaler Bestandteil der „clathrin-coated vesicles“, die bei der Endocytose eine bedeutende Rolle spielen (Roth *et al.*, 1969; Rothman und Fine, 1980; Kinnon und Owen, 1983; Lemansky *et al.*, 1987). Die Interaktion von SpClc1 und SpSte20 wird durch die im SpSte20-Protein vorhandene HR1-Domäne vermittelt. Eine mögliche Interaktion von SpClc1 und SpSte20 wirft verschiedene Fragen auf. Zunächst wäre es interessant zu klären, ob diese Interaktion innerhalb von Eukaryonten konserviert ist. Da es bislang ungeklärt ist, wann und wie die TOR-Komplexe an die Membran binden, sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Membranassoziation des TOR-Komplex 2 möglicherweise durch SpClc1 vermittelt wird.

5.4.1 Interaktion von ScAVO3 und ScCLC1

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen der leichten Kette des Clathrins und der TOR-Komplex 2-Komponente SpSte20/ ScAVO3/ mRictor in Eukaryonten konserviert ist. Ein Aminosäure-Sequenzvergleich der homologen Proteine – SpSte20, ScAVO3 und mRictor sind dem Anhang 8.3 zu entnehmen. Dieser zeigt eine geringe Aminosäure-Identität dieser Proteine (mRICTOR-SpSte20: 16%; mRICTOR-ScAVO3: 15%; SpSte20-ScAVO3: 24%), jedoch sind sowohl in den Hefen, als auch in Säugern bestimmte Domänen konserviert („calcium binding site“, „calmodulin binding site“, „heptad repeat“), die gemeinsame Funktionen dieser Proteine vermuten lassen (Brodsky *et al.*, 1991). Die „Heptad repeat“ oder HR1-Domänen sind sowohl in *S. pombe* auch in *S. cerevisiae* und Säugern jeweils am N-Terminus zu finden. Dort vermitteln HR1-Domänen oftmals die Interaktion von Proteinen an RHO-GTPasen (Palmer *et al.*, 1995; Shibata *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 1998; Maesaki *et al.*, 1999; Sayers *et al.*, 2000). Hier sollte untersucht werden, ob die homologen Proteine aus *S. cerevisiae*, die HR1-Domäne von ScAVO3 (entspricht SpSte20) und ScCLC1 (entspricht SpClc1), ebenfalls aneinander binden. Dazu wurde die HR1-Domäne (von As 7 bis As 183) von ScAVO3 mit der GAL4-AD fusioniert, während ScCLC1 die GAL4-BD angehängt wird. Sollten diese Fusionsproteine interagieren, würden auch die GAL4-AD und -BD in räumliche Nähe zueinander geraten, somit einen funktionellen Transkriptionsfaktor bilden und die Expression der, durch GAL4 regulierten, Reportergene

ermöglichen. Als Positivkontrolle wurde das SV40 T-Antigen und Murin p53 verwendet. Es ist bekannt, dass diese beiden Proteine aneinander binden (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Als Negativkontrollen dienten sowohl die Leervektoren pGADT7 und pGBKT7 als auch jeweils einer dieser beiden Vektoren als Leervektor zusammen mit einem der beiden zu testenden Vektoren. Das in Abbildung 5.30 auf YNBD *leu⁻ trp⁻ his⁻*-Medium und YNBD *leu⁻ trp⁻ ade⁻*-Medium zu sehende Wachstum der Zellen, in denen die HR1-Domäne von ScAVO3 an die Aktivierungsdomäne und ScCLC1 an die Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors ScGAL4 fusioniert sind, weist auf eine Interaktion von ScHR1 des AVO3-Proteins und ScCLC1 hin. Dabei wurden zwei unabhängige Transformanden getestet, die ein geringfügig unterschiedliches Wachstumsverhalten zeigten. Allerdings wachsen die Zellen, in denen der Leervektor pGADT7 und das Plasmid, welches ScCLC1 mit angehängter Bindedomäne enthält, vergleichbar auf YNBD *leu⁻ trp⁻ his⁻*. +3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT)-Medium. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor des ScHIS3 Proteins. Da 3-AT eine geringe Expression von *HIS3* verhindert, wird ein Hintergrundwachstum unterdrückt. Fügt man dem Medium hier 5 mM 3-AT hinzu, ist das Wachstum der genannten Zellen (Leervektor pGADT7 + ScCLC1 in pGBKT7) im Vergleich zu den beiden Transformanden, in denen jeweils die HR1-Domäne von ScAVO3 an die Aktivierungsdomäne und ScCLC1 an die Bindedomäne des Transkriptionsfaktors ScGAL4 fusioniert sind, abgeschwächt. Wird das Wachstum auf YNBD *leu⁻ trp⁻ ade⁻*-Platten untersucht, zeigt sich ein Unterschied zwischen den Negativkontrollen und zu testenden Zellen. Aufgrund der durchgeführten Zwei-Hybrid-Analysen scheint die Interaktion des Clathrin-Proteins und dem TOR-Komplex 2-Mitglied innerhalb der beiden untersuchten Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* konserviert zu sein.

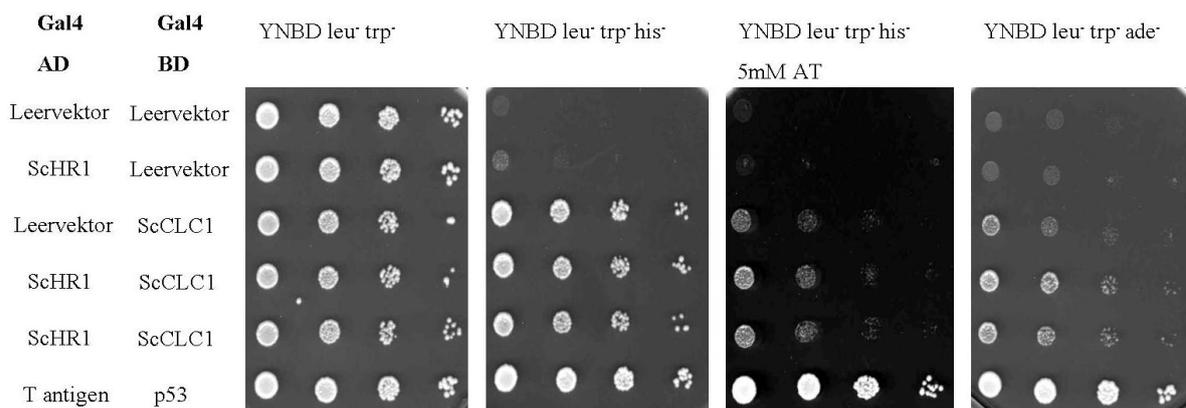


Abbildung 5.30: Zwei-Hybrid-Analysen zur Interaktion von ScClc1 und der HR1-Domäne von ScAVO3. Der *S. cerevisiae* Stamm AH109 (Genotyp: *MATa trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, Δgal4 Δgal80 LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*) wurde jeweils mit den entsprechenden Plasmiden (pGADT7:Leervektor-enthält die DNA-Sequenz, kodierend für die ScGAL4-Aktivierungsdomäne, pGBKT7:Leervektor-enthält die DNA-Sequenz, kodierend für die ScGAL4-DNA-Bindedomäne, pGADT7-T-enthält DNA-Sequenzen, kodierend für das große T-Antigen die ScGAL4-Aktivierungsdomäne, pGBKT7-53-enthält DNA-Sequenzen, kodierend für p53 und die ScGAL4-DNA-Bindedomäne, pGC22-enthält DNA-Sequenzen, kodierend für die HR1-Domäne von ScAVO3 und die ScGAL4-Aktivierungsdomäne, pGC23-enthält DNA-Sequenzen, kodierend für ScCLC1 und die ScGAL4-DNA-Bindedomäne) transformiert und in YE5S bis zu einer von OD_{600nm} 0,6 - 0,8 kultiviert. ScHR1: HR1-Domäne von ScAVO3; GAL4 AD: Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors ScGAL4; GAL4 BD: Bindedomäne des Transkriptionsfaktors ScGAL4

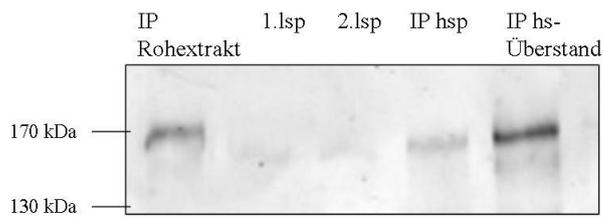
5.4.2 Bedeutung der HR1-Domäne für die Membranassoziation von SpSte20

TOR-Komplexe sind sowohl in Säugern als auch *S. cerevisiae* membranassoziiert (Cardenas und Heitmann, 1995; Kunz *et al.*, 2000; Wedamann *et al.*, 2003; Drenan *et al.*, 2004; Aronova *et al.*, 2007; Liu und Zheng, 2007; Sturgill *et al.*, 2008; Berchthold und Walther, 2009). Eine Membranassoziation der TOR-Komplexe in *S. pombe* ist bislang nicht bekannt, ebenso wenig wie die Funktion von SpClc1. In Säugern hingegen existieren einige Studien zu mCLC1. Das Protein mCLC1 entspricht der leichten Kette von Clathrin, während mCHC1 das Protein der schweren Kette von Clathrin darstellt. Drei leichte und drei schwere Clathrin-Ketten bilden Triskelion-Strukturen (Kirchhausen und Harrison, 1981; Ungewickell und Branton, 1981). Mehrere solcher Triskelion-Strukturen bilden die Clathrin-Vesikel, die einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen (Woodward und Roth, 1978; Keen *et al.*, 1979; Schook *et al.*, 1979; Nandi *et al.*, 1982; Blank und Brodsky, 1987). Diese Clathrin-Vesikel spielen eine bedeutende Rolle bei der Endocytose und sind somit zeitweise an der Membran lokalisiert (Rothman und Fine, 1980; Kinnon und Owen, 1983; Lemansky *et al.*, 1987). In *S. cerevisiae* ist eine Deletion von *chc1*⁺ lethal, wenn das Allel *scd1-i* („suppressor of clathrin deficiency

1“) vorhanden ist. Ein Stamm mit *scd1-v* Hintergrund bleibt bei einer *chc1*-Deletion lebensfähig, zeigt jedoch Wachstumsdefekte (Lemmon und Jones, 1987; Payne *et al.*, 1987; Nelson und Lemmon, 1993). Zellen ohne funktionelles ScCLC1 zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie *Δchc1 scd1-1* Mutanten. Sie sind lebensfähig, wachsen jedoch schlechter als der Wildtyp. Außerdem sind die rezeptorvermittelte Endocytose und die Reifung des Paarungspheromons α -Faktor beeinträchtigt (Payne *et al.*, 1987; Payne und Schekman, 1989). Das Level von ScCHC1 ist in *Δclc1* Zellen erheblich verringert. Eine verstärkte Expression von *chc1*⁺ in diesen Deletionsmutanten hebt die Defekte des Wachstums und der Reifung des Paarungspheromons auf. Die Rolle von ScCLC1 bei der Bildung der Clathrin-Vesikel in der Endocytose kann jedoch nicht von ScCHC1 übernommen werden. Desweiteren wurde *clc1*⁺ als multicopy Suppressor von lethalen *chc1*-Deletionsstämmen identifiziert (Huang *et al.*, 1997).

Im Folgenden sollte ermittelt werden, ob die Interaktion von SpSte20 und SpClc1 für die Lokalisation des TOR-Komplex 2 von Bedeutung ist. Dazu wurden Zellfraktionierungen durch differentielle Zentrifugationsschritte vorgenommen. Abbildung 5.31 A stellt die Fraktionierung des Stammes dar, der *ste20*⁺-3HA exprimiert. Somit konnte das entsprechende Protein mittels anti-HA Antikörper in Western Blot-Analysen detektiert werden. Eine deutliche Bande zeigt sich in der Spur, die die löslichen Proteine aufweist („Ip hs-Überstand“), aber es ist auch ein deutlicher Anteil in der Fraktion der Membran- und membranassoziierten Proteine vorhanden. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass SpSte20, als Bestandteil des TOR-Komplex 2 in *S. pombe*, zeitweise oder teilweise an der Membran lokalisiert ist. Um zu untersuchen, ob für diese Assoziation möglicherweise eine Bindung an SpClc1 notwendig ist, wurde eine Zellfraktionierung mit einem Stamm, der *ste20*⁺-3HA *ΔHR1* exprimiert, durchgeführt. Bei fehlender HR1-Domäne im SpSte20-Protein ist im Zwei-Hybrid-System keine Interaktion mit SpClc1 mehr nachzuweisen (persönliche Mitteilung von Fr. Dr. Anja Lorberg). Eine Fraktionierung eines aus diesem Stamm hergestelltem Rohextrakt sollte daher Aussagen über die Bedeutung dieser Interaktion für die Membranassoziation von SpSte20 zulassen. In Abbildung 5.31 B zeigen die SpSte20 Δ HR1-3HA-Banden in den einzelnen Fraktionen vergleichbare Intensitäten, wie sie in der differentiellen Zentrifugation von SpSte20-3HA zu sehen sind. Möglicherweise spielen *in vivo* neben der HR1-Domäne weitere Faktoren eine Rolle, die die Lokalisation von SpSte20 beeinflussen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um Aussagen über die Rolle der HR1-Domäne von SpSte20 für dessen Membranassoziation zu treffen.

A



B

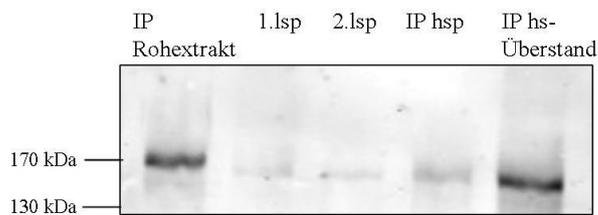


Abbildung 5.31: Bedeutung der HR1-Domäne des SpSte20-Proteins für die Membranassoziation von SpSte20.

A: Differentielle Zentrifugation des Stammes, welcher *ste20⁺-3HA* exprimiert (SPGC8-3A). Es wurden Rohextrakte hergestellt. Für die Immunpräzipitation des Rohextraktes wurden 2 mg Gesamtprotein eingesetzt. Für die differentielle Zentrifugation wurde mit 2 mg Gesamtprotein weitergearbeitet. Das erste „low speed pellet“ (1.lsp) wurde durch 5 min, 8.000 x g, 4°C erhalten. Der Überstand wird 5min bei 12.000 x g, 4°C zentrifugiert, woraus das zweite „low speed pellet“ (2.lsp) resultiert. Der Überstand wird einer Ultrazentrifugation unterzogen (1 h, 70.000 rpm, 4°C). Sowohl das Pellet (hsp), als auch der Überstand (hs-Überstand) werden einer Immunpräzipitation unterzogen. Alle Präzipitationen erfolgten mit 1 µl anti-HA (30 min) und 20 µl Protein G-Sepharose bei 4°C über Nacht. In anschließenden Western Blot-Analysen wurden als erster Antikörper anti-HA (1:10.000) eingesetzt. Es wurde mit dem „Odyssey“-System gearbeitet.

B: Differentielle Zentrifugation des Stammes, welcher *ste20⁺-3HA ΔHRI* exprimiert (SPAD99). Die Durchführung erfolgte, wie unter „A“ beschrieben.

6 Diskussion

6.1 Konservierung der TOR-Komplexe

6.1.1 Existenz von homologen Proteinen der TOR-Komplex-Mitglieder

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass sowohl in Säugern, als auch in *S. cerevisiae* TOR-Komplexe existieren (Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Loewith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Wedamann *et al.*, 2003). In *Dictyostelium discoideum* wurden neben den homologen Proteinen des TOR-Komplex 2 (Chen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999) auch die Zusammensetzung eines TOR-Komplex 2 postuliert (Lee *et al.*, 2005).

Zu diesem Zeitpunkt gab es Studien, die sich mit dem TOR-Weg in *S. pombe* befasst haben, die jedoch keinen Aufschluss über die Existenz von TOR-Komplexen gaben. In Anhang 8.1 sind Sequenzvergleiche zwischen den TOR-Komplex-Mitgliedern aus Säugern und *S. cerevisiae* und den homologen Proteinen aus *S. pombe* dargestellt. Die relativ geringe Sequenzähnlichkeit zwischen Säuger- und *S. pombe*-Homologen ist für einen Vergleich dieser beiden Spezies nicht ungewöhnlich. Betrachtet man jedoch die Domänenstruktur der mTOR-Komplex-Mitglieder mit der der homologen Proteine aus *S. pombe*, lässt dies auf konservierte Proteine schließen. So haben alle TOR-Proteine aus Eukaryonten die in Abbildung 3.1 gezeigte Domänenstruktur gemeinsam. Aber auch bei den homologen Proteinen mRAPTOR und SpMip1 z. B. zeigt das Vorhandensein der RNC („RAPTOR-N-terminal-conserved“-) Domäne und der „WD40-repeats“ in beiden Proteinen eine Konservierung an (Shinozaki-Yabana *et al.*, 2000; Yang und Guan, 2007). Auch von den fünf, in mSIN1 vorhandenen, SCD („Sin1-conserved-domains“-) Domänen ist mindestens eine in den homologen Proteinen anderer eukaryontischer Organismen zu finden (Wang und Roberts, 2005).

6.1.2 Existenz von TOR-Komplexen

6.1.2.1 Existenz von TOR-Komplexen in *S. pombe*

Die in Kapitel 5.1.2 beschriebenen Ko-Immünpräzipitationen wurden mit Stämmen durchgeführt, bei denen die Produktion der jeweiligen Fusionsproteine unter der Kontrolle der natürlichen Promotoren stand. Es wurden Interaktionen zwischen folgenden Proteinen nachgewiesen: SpTor2 und SpMip1 (Abbildung 5.1), SpTor2 und SpWat1 (Abbildung 5.2), SpMip1 und SpWat1 (Abbildung 5.3), SpTor1 und SpSin1 (Abbildung 5.9), SpTor1 und SpSte20 (Abbildung 5.10), SpTor1 und SpWat1 (Abbildung 5.11), SpSin1 und SpSte20

(Abbildung 5.12), SpWat1 und SpSin1 (Abbildung 5.13) und SpWat1 und SpSte20 (Abbildung 5.14). Keine Interaktionen waren zu sehen zwischen den Proteinen: SpTor2 und SpSte20 (Abbildung 5.4), SpSin1 und SpTor2 (Abbildung 5.5), SpMip1 und SpSte20 (Abbildung 5.6), SpMip1 und SpSin1 (Abbildung 5.7) und SpTor1 und SpMip1 (Abbildung 5.15). Diese Daten bestätigen die Existenz von zwei TOR-Komplexen in *S. pombe*, die demnach folgendermaßen aufgebaut sind. Der TOR-Komplex 1 setzt sich aus SpTor2, SpMip1 und SpWat1 zusammen (Abbildung 6.1). Die Mitglieder des TOR-Komplex 2 heißen SpTor1, SpSte20, SpSin1 und SpWat1 (Abbildung 6.1).

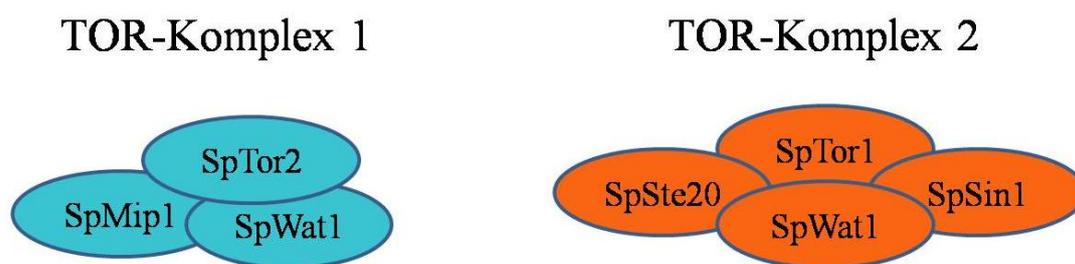


Abbildung 6. 1: Zusammensetzung der TOR-Komplexe in *S. pombe* gemäß der, in dieser Arbeit vorgestellten, Daten.

Parallel zu den hier durchgeführten Studien, sind mittlerweile einige Daten anderer Arbeitsgruppen veröffentlicht worden. Studien von Alvarez und Moreno (2006) bestätigen die in dieser Arbeit beobachtete Zusammensetzung der TOR-Komplexe. Allerdings wurden hier lediglich Interaktionen zwischen SpTor1 und SpMip1, SpSte20 oder SpWat1 und SpTor2 und SpMip1, SpSte20 und SpWat1 festgestellt. Ob SpSin1 ebenfalls ein Mitglied eines der beiden TOR-Komplex-Mitglieder ist, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Außerdem wurden, im Gegensatz zu dieser Arbeit, keine Ko-Immunpräzipitationen zwischen den einzelnen Mitgliedern (z. B. SpSte20 und SpSin1 oder SpSte20 und SpMip1) durchgeführt, um Subkomplexe auszuschließen.

Die Interaktionspartner von SpTor1 wurden ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Yamamoto analysiert (Matsuo *et al.*, 2007). Dabei wurden die Gene *mip1⁺*, *sin1⁺*, *ste20⁺* und *wat1⁺* inklusive der DNA-Sequenzen für eine 3HA- oder 13MYC-Fusion unter dem jeweils nativen Promotor exprimiert. Die beiden Fusionsproteine SpTor1-Flag und SpTor2-Flag hingegen wurden extrachromosomal mittels eines *nmt41*-Promotors produziert. Dieser Promotor wird durch die Zugabe von Thiamin reprimiert, während ohne Thiamin eine moderate Expression der Gene erfolgt. So wurden Interaktionen zwischen SpTor2 und SpMip1, SpTor1 und SpSin1, SpTor2 und SpSin1, SpTor1 und SpSte20, SpTor2 und SpSte20, SpTor1 und SpWat1

und SpTor2 und SpWat1 beobachtet. Den Daten nach Matsuo *et al.* zufolge setzt sich der TOR-Komplex 1 aus SpTor2, SpMip1 und SpWat1 zusammen, während der TOR-Komplex 2 aus SpTor1 und/oder SpTor2, SpSin1, SpSte20 und SpWat1 besteht (Abbildung 6.2). Ko-Immunpräzipitationen bezüglich möglicher Subkomplexe wurden auch hier nicht durchgeführt. Die hier, im Gegensatz zu unseren Daten, aufgeführte Beteiligung von SpTor 2 am TOR-Komplex 2 ist möglicherweise als Artefakt auf eine Überproduktion von SpTor2 zurückzuführen.

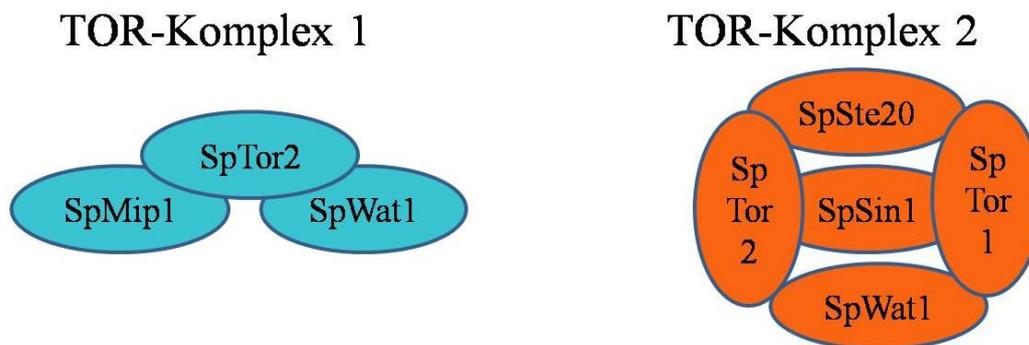


Abbildung 6 2: Zusammensetzung der TOR-Komplexe in *S. pombe* nach Matsuo *et al.*, 2007.

Eine weitere Publikation beschäftigte sich ebenfalls mit den Bindepartnern von SpTor1 und SpTor2 in *S. pombe*. Hayashi *et al.* (2007) produzierten SpFLAG-Tor1 bzw. SpFLAG-Tor2 unter der Kontrolle des nativen Promotors. Die nach der Reinigung von SpTor1 bzw. SpTor2 assoziierten Proteine waren als Banden in einem Coomassie-Gel sichtbar und wurden anschließend massenspektroskopisch untersucht. Hierbei ergaben sich für SpTor1 folgende Interaktionspartner: SpSin1, SpSte20, SpWat1, SpCC777.08c, SpCC622.13c, SpOrb5 und SpTel2. Mit SpTor2 wurden ko-immunpräzipitiert: SpMip1, SpWat1, SpBP18G5.03, SpCC162.12, SpCC622.13c, SpOrb5 und SpTel2. Die Interaktion von SpTel2 und SpTor1 und SpTel2 und SpTor2 wurde hier durch Ko-Immunpräzipitationen mit SpFLAG-Tor1/SpFLAG-Tor2 und SpTel2-myc bestätigt. Ein hier neu identifizierter Bindepartner von SpTor1 ist SpCC777.08c, welches homolog zu ScBit61 aus *S. cerevisiae* ist. ScBit61 ist ebenfalls ein Mitglied des TOR-Komplex 2 (Reinke *et al.*, 2004). SpCC622.13c ist in beiden TOR-Komplexen vorhanden und interagiert auch mit SpTel2 und wird daher auch als SpTti 1 (Tel Two interacting protein 1) bezeichnet. SpTti1 ist konserviert, homologe Proteine in Säugern (mKIAA0406) und *S. cerevisiae* (ScYkl033w) sind bekannt. Ebenfalls in beiden Komplexen finden sich SpOrb2 und SpTel2. SpOrb5 ist ein essentielles Protein, welches zu den Casein-Kinasen zählt (Snell und Nurse 1994). Auch SpTel2 ist essentiell. Gebunden an

SpTti1 interagiert es, neben SpTor1 und SpTor2, auch mit weiteren PI3K-verwandten Kinasen. So interagiert SpTel2 z. B. mit SpTra1 und SpTra2, welche die Transkription regulieren (Hayashi *et al.*, 2007; Kanoh und Yanagida, 2007). Außerdem wurde SpTel2 eine Rolle bei der Replikationskontrolle und bei der Antwort auf DNA-Schäden DNA zugeordnet, welche möglicherweise über die Interaktion mit SpRad3 und SpTel1 vermittelt wird (Zhao *et al.*, 2003; Shikata *et al.*, 2007). SpBP18G5.03 wurde SpToc1 („Tor complex 1“) genannt, wobei lediglich ein Homolog im Genom von *Schizosaccharomyces japonicus* („*Schizosaccharomyces japonicus* Sequencing project“) identifiziert ist. Das Protein SpCC162.12 entspricht dem TOR-Komplex 1-Mitglied ScTco89 in *S. cerevisiae* (Reinke *et al.*, 2004). In Abbildung 6.3 ist die Zusammensetzung der TOR-Komplexe nach Hayashi *et al.* (2007) dargestellt. Inwieweit SpOrb5 und SpTti spezifische TOR-Komplex-Mitglieder darstellen, ist noch unklar.

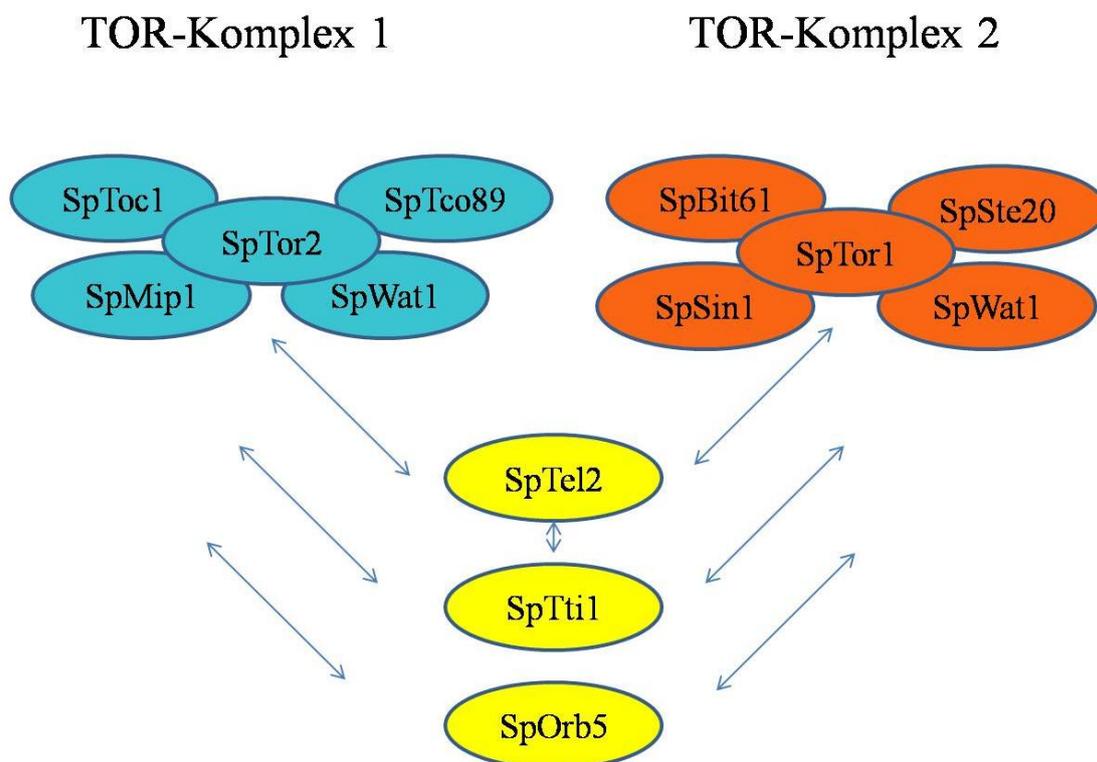


Abbildung 6 3: Zusammensetzung der TOR-Komplexe in *S. pombe* nach Hayashi *et al.*, 2007.

Neueste Studien deuten an, dass SpTor1 ebenfalls ein Mitglied des TOR-Komplex 1 ist (Hartmuth und Petersen, 2009). Weder die Ergebnisse dieser Arbeit, noch die Daten von Matsuo *et al.* (2007) bzw. Hayashi *et al.* (2007) wiesen auf SpTor1 als TOR-Komplex 1 Mitglied hin. Dieses ist damit zu erklären, dass die Interaktion von SpTor1 und SpWat1 in Minimalmedium detektiert wurde (Hartmuth und Petersen, 2009). Die in dieser Arbeit

vorgestellten Interaktionen hingegen wurden jeweils in Vollmedium und mit einer Zellkultur in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt. Somit deuten die neuesten Erkenntnisse alternative TOR-Komplex 1-Zusammensetzungen abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit hin. Dieses ist nicht verwunderlich, da die Funktionen der TOR-Proteine durch die Nährstoffbedingungen beeinflusst werden. In diesem Fall vermittelt SpTor1, als Teil des TOR-Komplex 1, den Eintritt in die Mitose unter Nährstoffmangel. Zusammenfassend wird hier die Zusammensetzung eines TOR-Komplex 1A in Vollmedium aus SpTor2, SpMip1 und SpWat1 und eines TOR-Komplex 1B in Minimalmedium aus SpTor1, SpMip1 und SpWat1 vorgeschlagen (Hartmuth und Petersen, 2009; Abbildung 6.4).

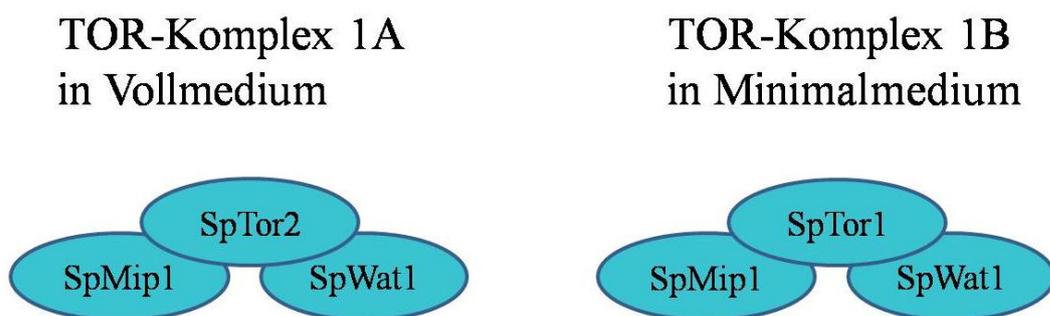


Abbildung 6. 4: Zusammensetzung des TOR-Komplex 1 in *S. pombe* abhängig von der Nährstoffverfügbarkeit. Nach Hartmuth und Petersen, 2009.

Die hier beschriebenen Daten weisen alle auf die Existenz von zwei TOR-Komplexen in *S. pombe* hin. Die TOR-Komplexe in Säugern und *S. cerevisiae* wurden in der Einleitung (3.2; 3.3) beschrieben. Außerdem wurde z. B. in dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* ein TOR-Komplex 2 nachgewiesen, der aus DdLst8 (Homolog zu SpWat1), DdRip3 (Homolog zu SpSin1) und DdPia (Homolog zu SpSte20) besteht. Es existiert kein mRAPTOR/ScKOG1/SpMip1-Homolog. In *D. discoideum* wird möglicherweise ein TOR-Komplex 1 aus anderen Proteinen gebildet (Lee *et al.*, 2005). Auch in *Chlamydomonas* wurden bereits TOR-Komplexe nachgewiesen (Dias-Troya *et al.*, 2008).

6.1.3 Phänotyp von TOR-Komplex-Mutanten

In Abbildung 5.17 sind die Phänotypen von $\Delta tor1$ -, $\Delta ste20$ - und $\Delta sin1$ -Mutanten zu sehen. Es war bereits postuliert, dass $\Delta tor1$ -Mutanten sensitiv gegenüber Kälte-, Hitze-, osmotischem oder oxidativem Stress sind (Kawai *et al.*, 2001; Weisman und Choder, 2001). Diese Sensitivität gegenüber osmotischem Stress zeigte sich hier auch bei $\Delta ste20$ - und $\Delta sin1$ -

Mutanten. Die Zugabe von 0,4 M KCl bzw. 0,2 M NaCl führte aufgrund des osmotischen Drucks zu einem Wasserverlust der Zelle. Calciumionen (hier: 0,02 M CaCl₂) bewirken eine veränderte Permeabilität der Zellmembran, welches wiederum eine Störung des Wasserhaushaltes der Zelle verursacht. Ohne geeignete Anpassungsmechanismen werden in Hefezellen aufgrund des Wasserverlusts sowohl Stoffwechselwege als auch der Transport und die Synthese von Proteinen und letztendlich das Wachstum gehemmt (Ruis und Schüller, 1995; Varela *et al.*, 1995; Gustin *et al.*, 1998; Mager und Siderius, 2002; Wojda *et al.*, 2003). Auch bei oxidativem Stress, hier 1 mM H₂O₂, ist ein schlechteres Wachstum der *Δste20*- und *Δsin1*-Mutanten zu erkennen. Falls die Zelle nicht in der Lage ist, auf diese Bedingungen zu antworten, lösen hohe Konzentrationen an Wasserstoffperoxid, neben anderen ROS („reactive oxygen species“), Apoptose in eukaryontischen Zellen aus (Hockenbery *et al.*, 1993; Kane *et al.*, 1993; Ghibelli *et al.*, 1995; Greenlund *et al.*, 1995; Slater *et al.*, 1995; Madeo *et al.*, 1999). Während bei 5 mM Koffein keine Änderung des Wachstumsverhaltens der *Ator1*-, *Δste20*- und *Δsin1*-Mutanten im Vergleich zu der YE5S-Kontrollplatte zu beobachten ist, wird das Wachstum durch die Zugabe von 10 mM Koffein geschwächt. Koffein übt seine Wirkung über den Zellzyklus aus, wobei bestimmte Kontrollpunkte der einzelnen Phasen übergangen werden (S-M; G2-M) (Moser *et al.*, 2000). Ebenso wachsen die hier getesteten Mutanten geringfügig schlechter, wenn dem Medium 30 µg/ml Ethionin zugegeben wurde. In *S. cerevisiae* ist bekannt, dass es seine toxische Wirkung als Methionin-Analogon ausübt (Sorsoli *et al.*, 1964). Das toxische Arginin-Analogon Canavanin (Grenson *et al.*, 1968) bewirkte hier keine phänotypische Veränderung. Die Ähnlichkeit der Phänotypen weist zum Einen darauf hin, dass diese Proteine ähnliche Funktionen in der Zelle ausüben. Die biochemischen Daten der Zusammensetzung des TOR-Komplex 2 werden damit ergänzt und bestätigt. Zum Anderen deutet sich eine mögliche gemeinsame Funktion des TOR-Komplex 2 bezüglich der Antwort auf verschiedene, vor allem osmotische und oxidative, Stressbedingungen an. Dieses wird dadurch untermauert, dass SpSin1 mit SpSty1 interagiert (Wilkinson *et al.*, 1999) und dessen Funktion beeinflusst. SpSty1 ist Bestandteil des SAPK-Signaltransduktionswegs („stress-activated-MAPK Pathway“), der den Zellzyklus, die Meiose und die Antworten auf Nährstoffmangel, oxidativen, osmotischen, und Hitze-Stress reguliert (Warbrick and Fantès, 1991, Millar *et al.*, 1995; Shiozaki and Russel, 1995; Kato *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 1997; Banuett, 1998; Samejima *et al.*, 1998). Über SpSty1, aber auch unabhängig von dem SPAK-Weg, wird durch SpSin1 letztendlich die Transkription von verschiedenen Stressantwortgenen reguliert (Toda *et al.*, 1991; Takeda *et al.*, 1995; Shiozaki *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996, Wilkinson *et al.*, 1999). Dabei werden unter anderem die Gene

gpd1⁺ und *ctt1*⁺ induziert (Degols *et al.*, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996; Degols und Russell, 1997). Das Gen *gpd1*⁺ kodiert für die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase, welche ein Schlüsselenzym der Glycerolsynthese darstellt und somit entscheidend zur Steigerung der intrazellulären Osmolarität bei hyperosmotischen Stress, wie z. B. hier durch die Zugabe von 0,4 M KCl oder 0,2 M NaCl, beiträgt (Pidoux *et al.*, 1990; Ohmiya *et al.*, 1995). Die Induktion des Gens *ctt1*⁺ führt zur vermehrten Produktion der cytoplasmatischen Katalase, die H₂O₂ abbaut und die Zellen so vor oxidativem Stress schützt (Nakagawa *et al.*, 1995).

In *S. cerevisiae* konnte die Beteiligung von TOR bei der Antwort auf verschiedene Stressbedingungen gezeigt werden. So reguliert ScTor1 die Expression von *ENA1*, ein Gen, das für einen Natrium- und Lithiumkanal kodiert, und bedeutend für Salzstresstoleranz ist. Diese Regulation erfolgt über die TOR-regulierten Transkriptionsfaktoren ScGln3 und ScGat1 (Crespo *et al.*, 2001). Desweiteren wird die hunger- und stressabhängige Lokalisation von ScMsn2 durch ScTor1, reguliert (Mayordomo *et al.*, 2002; Santhanam *et al.*, 2004). ScMsn2 aktiviert die Transkription von STRE („stress response element“-Genen als Antwort auf die Kohlenstoffverfügbarkeit und verschiedene Stressbedingungen. Ist z. B. ausreichend Glukose vorhanden, ist ScMsn2 im Cytosol, während es bei Kohlenstoffhunger im Zellkern lokalisiert ist und dort die Expression von zahlreichen Genen beeinflusst (Schmitt und McEntee, 1996; Görner *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998; Beck und Hall, 1999; Lallet *et al.*, 2004). Sowohl die Regulation von ScMsn2, als auch von ScGln3 wird über den ScTor1-ScPP2A-ScTap42-Zweig vermittelt (Mayordomo *et al.*, 2002; Cox *et al.*, 2004; Santhanam *et al.*, 2004).

Auch in Säugern reguliert mTOR das Zellwachstum in Abhängigkeit von Nährstoffen und bestimmten Stresssituationen, wie z. B. bei osmotischem oder oxidativem Stress (Bae *et al.*, 1999; Parrott und Templeton, 1999; Huang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2002; Fumarola *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006). Niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Hypoxie) aktivieren den TSC-Komplex, was wiederum zur Hemmung der TOR-Komplex 1-Funktionen führt. Somit werden die TOR-Effektor-Proteine m4EBP1 und mS6K inhibiert. Dies führt zu einer eingeschränkten Proteinsynthese unter den entsprechenden Bedingungen (Liu *et al.*, 2006). Hyperosmotischer Stress bewirkt ein Schrumpfen der Zelle und eine Dephosphorylierung von m4EBP1 und mS6K (Parrott und Templeton, 1999; Fumarola *et al.*, 2005). Neben der Involvierung dieser TOR-Komplex 1-Effektorproteine, ist auch eine Beteiligung des TOR-Komplex 2 bei Osmostress, durch Veränderungen des Cytoskeletts, denkbar. Die Aktivität der mS6Kinase wird ebenfalls durch H₂O₂ auf verschiedene Weise moduliert. Dabei wurde die mS6-Kinase je nach Zelltyp, Dosis und Dauer der

Wasserstoffperoxid-Behandlung gehemmt oder aktiviert (Bae *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2002). Die Rolle von TOR bei der Adaption von Zellen an sich ändernde äußere (Stress-) Bedingungen scheint also konserviert zu sein. Die in dieser Arbeit durchgeführten phänotypischen Analysen von Mutanten des TOR-Weges in *S. pombe* unterstreichen die Bedeutung der TOR-Proteine für die Stressantwort auch in diesem Organismus.

6.1.4 Komplementationsanalysen von TOR-Komplex-Mutanten aus *S. cerevisiae* und *S. pombe*

Die in Kapitel 5.1.4 dargestellten Komplementationsanalysen zeigen, dass weder SpMip1 noch SpSin1 oder SpSte20 die homologen Proteine aus *S. cerevisiae* (ScKOG1, ScAVO1, ScAVO3) ersetzen können. Im Falle der Komplementationsanalyse des konditionellen Stammes *GAL_{prom}-AVO1* durch *sin1*⁺ sollte jedoch erwähnt werden, dass das *sin1*⁺-Gen auch Introns enthält. Da die Untersuchungen in einem *S. cerevisiae*-Stamm durchgeführt wurden, ist es möglich, dass hier die entsprechende mRNA nicht korrekt gespleißt wurde, und es so zu keiner Komplementation kommen kann. Um eine endgültige Aussage über eine mögliche Komplementation von *Δavo1*-Mutanten durch *sin1*⁺ treffen zu können, sollte cDNA von *sin1*⁺ in einem *GAL_{prom}-AVO1*-Stamm exprimiert werden.

In Abbildung 5.21 konnte eine Komplementation von *Δlst8*-Mutanten durch *wat1*⁺ mittels zwei verschiedener Methoden gezeigt werden (Kapitel 5.1.4.4). Es wurde ein *GAL_{prom}-LST8*-Stamm verwendet. Unter nicht-induzierten Bedingungen (ohne Galaktose) war die Expression von *LST8* abgeschaltet und die Zellen nur durch die extrachromosomale Expression von *LST8* (Positivkontrolle) oder *wat1*⁺ lebensfähig. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde außerdem mit einem Stamm gearbeitet, bei dem *LST8* deletiert war. Das Wachstum der Zellen wurde hier durch die Expression von *LST8* durch ein Plasmid gewährleistet. Auf diesem Plasmid ist zusätzlich das Gen *URA3* enthalten, welches für die Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase kodiert. Dieses wichtige Enzym in der Pyrimidinsynthese, dient hier zur Selektion der Zellen. Bei der Aufnahme von 5'-Fluororotsäure (FoA) aus dem Medium wird FoA durch die Orotidin-5-phosphat-Decarboxylase zu toxischem 5'-Fluorouracil umgewandelt. Auf diese Weise werden die Zellen selektiert, die das Ursprungsplasmid mit der *URA3*-Marke nicht mehr tragen, aber, bedingt durch ein weiteres *LEU2*-basierendes Plasmid, dennoch lebensfähig sind. Dies waren in der vorliegenden Arbeit die Zellen, die entweder *LST8* (Positivkontrolle) oder *wat1*⁺ auf einem *LEU2*-Vektor exprimierten. Somit war in diesem Versuchsansatz *wat1*⁺ ebenfalls in der Lage, den Wachstumsdefekt durch die *lst8*-Deletion

aufzuheben. Dieses geht mit der Tatsache einher, dass zwischen den entsprechenden Proteinen auch die höchste Aminosäureidentität von 66% besteht (Anhang 8.1).

Bereits bekannt ist, dass die katalytischen Domänen von ScTor1 und ScTor2 austauschbar sind (Helliwell *et al.*, 1994). Ebenso wurden Untersuchungen durchgeführt, ob die Proteine ScTor1/ ScTor2 funktionell durch mTOR ersetzt werden können. Dabei war das Volllängenprotein mTOR nicht in der Lage ScTor1 oder ScTor2 zu ersetzen. Wurden jedoch Hybride hergestellt, in dem ein Großteil des *S. cerevisiae* Proteins erhalten blieb und lediglich die Kinasedomäne von mTOR stammte, konnte eine Komplementation von einer *TOR2*-Mutante beobachtet werden, während dies für *TOR1* nur teilweise zutraf (Alarcon *et al.*, 1996). Komplementationsanalysen mit *S. pombe* Proteinen wurden lediglich mit SpSin1 durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass ein Fusionsprotein aus den ersten 486 Aminosäuren des SpSin1-Homologen aus *Gallus gallus* - GgSin1 - und den C-terminalen 182 Aminosäuren von SpSin1 den Phänotyp der *Δsin1*-Mutanten unterdrücken konnte. Das Volllängen-GgSin1 war dazu nur zum Teil in der Lage (Wilkinson *et al.*, 1999).

Um die Konservierung der TOR-Komplex-Mitglieder tiefergehend zu untersuchen, wäre es interessant, Komplementationsanalysen mit den homologen Proteinen aus Säugern in *S. pombe*- bzw. *S. cerevisiae*-Mutanten durchzuführen.

6.2 Einfluss von Rapamycin auf den TOR-Signalweg in *S. pombe*

In Säugern und *S. cerevisiae* bindet Rapamycin an FKBP12, um dann als Komplex an die FRB-Domäne des TOR-Proteins zu binden (Abbildung 3.1; Heitmann *et al.*, 1991; Koltin *et al.*, 1991; Bram *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 1993; Helliwell *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Choi *et al.*, 1996). Dadurch kommt es, sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Säugern, zu der Hemmung des Zellzyklus in der G1-Phase und des vegetativen Wachstums (Schmidt *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997; Cutler *et al.*, 1999; Dennis *et al.*, 1999; Peterson *et al.*, 2000; Schmelzle und Hall, 2000; Loewith *et al.*, 2002; Edinger *et al.*, 2003; Jacinto *et al.*, 2004; De Virgilio und Loewith, 2006). Dies wird über bestimmte TOR-Zielproteine vermittelt. So wird in Säugern die Translation über eine verminderte Aktivität der mS6-Kinase und mE4E inhibiert (Calvo *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 1992; Kuo *et al.*, 1992; Price *et al.*, 1992; Ferrari *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995; Berreta *et al.*, 1996; Brunn *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002). Zum Erliegen des Zellzyklus kommt es über die Modulation bestimmter CDKs bei Rapamycin-Zugabe (Morice *et al.*, 1993; Nourse *et al.*, 1994; Barbet *et al.*, 1996). Neben diesen eingeschränkten TOR-Komplex 1-Funktionen wird bei einer längeren Rapamycin-Behandlung auch die TOR-Komplex 2-abhängige Phosphorylierung von mAKT in

bestimmten Zelltypen (z. B. PC3-Zellen) inhibiert (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2006).

In *S. pombe* bewirkt Rapamycin keine Hemmung des vegetativen Wachstums, sondern inhibiert die sexuellen Entwicklung und die Leucin-Aufnahme (Weisman *et al.*, 2001; Weisman *et al.*, 2005).

6.2.1 Interaktion von SpFkh1 und SpTor1 und SpTor2

Das Protein SpFkh1 stellt das homologe Protein zu mFKBP12 dar. Abbildung 5.22 zeigt Ko-Immunpräzipitationen von SpFkh1 und SpTor1 in An- oder Abwesenheit von Rapamycin. Eine Interaktion der beiden Proteine war lediglich bei der Zugabe von Rapamycin zu sehen. Auch eine Interaktion von SpFkh1 und SpTor2 wurde nur bei Rapamycin beobachtet (Abbildung 5.23). Da Rapamycin die sexuelle Entwicklung bei Stickstoffmangel inhibiert und es daher denkbar war, dass der SpFkh1-Rapamycin-Komplex nur bzw. vor allem unter Stickstoffmangel an die TOR-Proteine bindet, wurden diese Immunpräzipitationen auch in Minimalmedium ohne Aminosäuren durchgeführt. Es war kein Unterschied zwischen den Ko-Immunpräzipitationen in Voll- oder Minimalmedium sichtbar. In einer Studie konnte in einem Zwei-Hybrid-System die Interaktion der FRB-Domäne von SpTor1 und SpFkh1 in Anwesenheit von Rapamycin beobachtet werden (Weisman *et al.*, 2005). Die Daten dieser Arbeit belegen, dass Interaktionen von SpFkh1 mit SpTor1 und SpFkh1 mit SpTor2 *in vivo* stattfinden. Aufgrund der Wirkung von Rapamycin auf die SpTor1-abhängige Leucin-Aufnahme (Weisman *et al.*, 2005), war eine Interaktion von SpFkh1 und SpTor1 zu erwarten. Bislang sind jedoch keine Rapamycin-sensitiven SpTor2-Funktionen bekannt. Es gibt aber Hinweise darauf, dass Rapamycin seine Wirkung auch auf SpTor2 auswirkt. So sind *Δtor1* Zellen Rapamycin-sensitiv, während die Doppeldeletionsmutanten *Δtor1Δfkh1* nicht sensitiv sind (Weisman *et al.*, 2005). Es muss also mindestens ein weiteres Protein existieren, über welche diese Rapamycin-Sensitivität vermittelt wird. Die Rapamycin-Resistenz der *Δtor1Δfkh1*-Mutanten deutet eine Beteiligung von SpFkh1 an. Aufgrund der FRB-Domäne ist SpTor2 als weiteres Ziel für Rapamycin denkbar. Die aus diesen Überlegungen resultierende Hypothese, dass Rapamycin als Komplex mit SpFkh1 an die FRB-Domäne von SpTor2 bindet und so dieses inhibiert, geht mit der, in dieser Arbeit gezeigten, Interaktion von SpFkh1 und SpTor2 konform.

Da nach Matsuo *et al.* (2007) SpTor2 möglicherweise ebenfalls ein Mitglied des TOR-Komplex 2 ist, müsste durch weitere Ko-Immunpräzipitationen untersucht werden, ob SpFkh1 durch die Interaktion mit SpTor1 an den TOR-Komplex 2 bzw. durch die Interaktion

mit SpTor2 an den TOR-Komplex 1 bindet. Interaktionsstudien zwischen SpFkh1 und dem TOR-Komplex 1-Mitglied SpMip1 und SpFkh1 und dem TOR-Komplex 2-Mitgliedern SpSte20 oder SpSin1 könnten Aufschluss darüber geben, ob Rapamycin an einen oder beide TOR-Komplexe in *S. pombe* bindet. Dies war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

6.2.2 Phänotypische Untersuchungen von TOR-Komplex 2-Deletionsmutanten in Anwesenheit von Rapamycin

Die in Abbildung 5.24 gezeigten phänotypischen Analysen zeigen die Rapamycin-Sensitivität von $\Delta tor1$ -, $\Delta sin1$ - und $\Delta ste20$ -Mutanten. Sowohl in Vollmedium, als auch unter bestimmten Stressbedingungen wie 0,2 M NaCl wachsen diese Stämme in der Anwesenheit von 100 ng/ml Rapamycin schlechter, als es bereits ohne Rapamycin unter diesen Bedingungen beobachtet wurde. Da die deletierten Gene jeweils für Proteine des TOR-Komplex 2 kodieren, unterstreicht die Rapamycin-Sensitivität dieser Mutanten die Hypothese, dass auch Funktionen des TOR-Komplex 1 durch Zugabe von Rapamycin inhibiert werden (Kapitel 6.2.1). Diese Hemmung macht sich nur bei der Deletion von entweder *tor1*, *sin1* oder *ste20* im vegetativen Wachstum, vor allem unter osmotischen Stressbedingungen, bemerkbar. Möglicherweise wird hier durch einen stressbedingten Defekt in der Membran der Eintritt von Rapamycin in die Zelle erleichtert, wodurch eine höhere Konzentration an Rapamycin-SpFkh1-Komplexen eine höhere Sensitivität hervorgerufen wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der SpFkh1-Rapamycin-Komplex eine höhere Affinität zu SpTor1 als zu SpTor2 hat und seine Wirkung vor allem über SpTor1 ausübt. Im Falle einer Deletion von *tor1*⁺ würde es zu einer vermehrten Bindung des SpFkh1-Rapamycin-Komplexes an SpTor2 und dadurch zur Hemmung von dessen Funktionen kommen. Da SpTor2 essentiell für das vegetative Wachstum von *S. pombe* ist, führt dessen Hemmung zu den gezeigten Wachstumsdefekten. In diesem Fall wäre vermutlich noch eine für ein geringes Wachstum ausreichende Menge an, nicht an SpFkh1-Rapamycin- gebundene, SpTor2-Proteine in der Zelle vorhanden.

Desweiteren ergänzen die auch in Anwesenheit von Rapamycin ähnlichen Phänotypen der $\Delta tor1$ -, $\Delta sin1$ - und $\Delta ste20$ -Mutanten, die biochemischen Daten, dass SpTor1, SpSin1 und SpSte20 Mitglieder des gleichen TOR-Komplexes darstellen.

6.2.3 Rapamycin-Sensitivität bei der Überexpression von *tor1*⁺ und *tor2*⁺

Die durch einen *nmt1*-Promotor gesteuerte chromosomale Überexpression von *tor1*⁺ führt zu einem schlechteren Wachstum der Zellen in Minimalmedium (Abbildung 5.25). Da dies weder durch osmotische noch durch oxidative Stressbedingungen verstärkt wurde, handelt es sich um einen generellen Wachstumsdefekt. Dieses könnte verschiedene Ursachen haben. Die unphysiologisch hohe Konzentration von SpTor1 könnte zu diesem Ergebnis führen. Möglicherweise sind auch nicht genug Chaperone oder andere für die Faltung und Funktionalität von SpTor1 notwendigen und normalerweise in ausreichendem Maße koproduzierten Proteine verfügbar. Das überproduzierte SpTor1 könnte andere Mitglieder des TOR-Komplex 1 titrieren, so dass dieser seine Funktionen nicht mehr ausüben kann und so zu dem beobachteten verminderten Wachstum führt.

Eine andere mögliche Erklärung für das schlechtere, vegetative Wachstum bei einer SpTor1-Überproduktion wird im Folgenden beschrieben. In Zellen, in denen *tor1*⁺ deletiert wurde, war der G1-Arrest und die sexuelle Entwicklung gestört, weshalb der beobachtete Phänotyp auch als „never starved for nitrogen“ bezeichnet wurde (Weisman *et al.*, 2007). Durch die Überexpression von *tor1*⁺ könnte der gegensätzliche, also „always starved for nitrogen“-Phänotyp hervorgerufen werden, wie er auch für *tor2-ts* Mutanten beschrieben wurde (Weisman *et al.*, 2007). Wie bei Stickstoffmangel würden die Zellen dann unter dem Mikroskop als kleine, abgerundete Zellen zu erkennen sein, da die Mitose hier bei einer reduzierten Zellgröße einsetzt (Fantès und Nurse, 1977; Young und Fantès, 1987). Außerdem würde *S. pombe* auch in Vollmedium in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren und die sexuelle Entwicklung einleiten. Ob dieses bei der Überexpression von *tor1*⁺ der Fall ist, könnte durch in zukünftigen Experimenten (FACS-Analysen, mikroskopische Untersuchungen) geklärt werden.

Außerdem sollten neben einem biochemischen Nachweis der SpTor1-Überproduktion, weitere Experimente folgen, um zu klären, warum die Anwesenheit von Rapamycin den Wachstumsdefekt der *tor1*⁺-Überexpression verstärkt.

6.3 Einfluss von Rapamycin auf das TORC2-Zielprotein SpGad8

In dieser Arbeit wurde eine Interaktion von SpFkh1 mit sowohl SpTor1 als auch SpTor2 in Anwesenheit von Rapamycin nachgewiesen (Abbildung 5.22; Abbildung 5.23). Daraus ergibt sich die Frage, ob der an die TOR-Proteine gebundene SpFkh1-Rapamycin-Komplex auch die Funktionen der TOR-Komplexe inhibiert. Das einzige bisher identifizierte Zielprotein des TOR-Komplex 2 in *S. pombe* ist die AGC-Kinase SpGad8 (Matsuo *et al.*, 2003):

6.3.1 Phosphorylierungstatus von SpGad8 in Abhängigkeit von Rapamycin

SpGad8 wird von SpTor1 an S546 und S527 phosphoryliert (Matsuo *et al.*, 2003). Mit Hilfe von drei methodisch verschiedenen Versuchsansätzen wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Rapamycin auf die Phosphorylierung von SpGad8 analysiert. In allen Fällen wurden die Proben wie in Kapitel 4.3.30 beschrieben hergestellt, so dass die Zellen nicht zentrifugiert, sondern abfiltriert und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Zum Einen wurde mittels Phospho-Serin-spezifischen Antikörper phosphoryliertes SpGad8 detektiert. Dabei war durch die Zugabe von Rapamycin keine Änderung der Intensität der Proteinbanden auszumachen (Abbildung 5.26). Zum Anderen sollten „Low Crosslinker“-Gele eine weitere Möglichkeit, den Phosphorylierungszustand von SpGad8 zu visualisieren, darstellen. Auch hier wurde keine Änderung des Bandenmusters von SpGad8 festgestellt (Abbildung 5.27). Desweiteren wurden „Phostag“-Gele genutzt, um bei einer Änderung des Phosphorylierungslevels einen Shift der SpGad8-Bande erkennen zu können. Für die „Phostag“-Gele wurden die Rohextrakte, neben der in Kapitel 4.3.30 beschriebenen Weise, auch alternativ mittels alkalischer Lyse hergestellt und die Proteine mit Trichlor-Esigsäure (TCA) gefällt. Oder die Zellen wurden direkt nach der Ernte mit NaF₃, das den physiologischen Zustand der Zelle zum Zeitpunkt der Ernte stabilisiert, behandelt und anschließend wie in Kapitel 4.3.30 beschrieben, fortgefahren. Die beiden alternativen Methoden wurden getestet, um den Phosphorylierungszustand von SpGad8 durch die anschließende Probenaufbereitung möglichst nicht zu beeinflussen. Um zu kontrollieren, ob sich SpGad8 zum Zeitpunkt T₀ im phosphorylierten oder dephosphorylierten Zustand befindet, wurde eine Kontrolle mitgeführt. Dazu wurde jeweils eine „T₀“-Probe mit Lambda-Phosphatase behandelt, um als Vergleich für dephosphoryliertes SpGad8 zu dienen. Da sich diese Kontrolle als unzuverlässig herausstellte, ist sie in den Abbildungen 5.26-5.28 nicht vorhanden. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass bei dephosphoryliertem SpGad8 –also bei erfolgreicher Behandlung mit der Lambda-Phosphatase- in einem „Phostag“-Gel ein deutlicher „Shift“ im Vergleich zu der nicht behandelten „T₀“-Probe zu sehen war, wenn die Proben nach Kapitel 4.3.30 hergestellt wurden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die verwendete Methode zuverlässig war, um die Phosphorylierung von SpGad8 während der Herstellung der Proben zu erhalten. Die „T₀“-Probe diente somit als Kontrolle für phosphoryliertes SpGad8 (Abbildung 5.28). Für das hier gezeigte „Phostag“-Gel wurde nach Kapitel 4.3.30 verfahren. Die „T₀“-Probe unterschied sich von den Proben der anderen Zeitpunkte weder in Signalstärke noch Bandenmuster/-höhe. Auch bei der Probenaufbereitung mittels alkalischer Lyse der Zellen und anschließender TCA-Fällung bzw. der Behandlung mit NaF₃ konnte kein

Shift von SpGad8 in Abhängigkeit von Rapamycin detektiert werden. Zusammenfassend wurde weder mittels Phospho-Serin-spezifischer Antikörper, noch in „Low-Crosslinker“-Gelen, noch durch die Verwendung von „Phostag“-Gelen eine Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus des SpGad8-Proteins von Rapamycin beobachtet.

Diese Daten widersprechen nicht zwangsläufig der Hypothese, dass die Bindung von SpFkh1-Rapamycin an SpTor1 bestimmte TOR-Funktionen inhibiert. Da der SpFkh1-Rapamycin-Komplex nicht an der Domäne mit der katalytischen Aktivität bindet, sondern an der benachbarten FRB-Domäne, müssen nicht alle Kinasefunktionen beeinträchtigt sein. In Säugern inhibiert Rapamycin die Phosphorylierung der mS6-Kinase, ein mTOR-Komplex1-Zielprotein. Ebenfalls ein mTOR-Komplex 1-Zielprotein ist m4EBP1. Die Kinaseaktivität von mTOR gegenüber m4EBP1 wurde bei gleicher Rapamycinkonzentration nur teilweise gehemmt (Feldmann *et al.*, 2009). So könnten auch in *S. pombe* bestimmte SpTor1-Kinase-Substrate mehr und andere weniger stark durch Rapamycin gehemmt werden. Die Erkenntnis über weitere Zielproteine von SpTor1 und SpTor2 würden weitere Untersuchungen diesbezüglich ermöglichen.

Eine andere Möglichkeit, um zu untersuchen, ob Rapamycin über SpTor1 Funktionen von SpGad8 beeinflusst, wäre die Kinaseaktivität von SpGad8 zu testen. Dafür könnte man ein Phosphorylierungsassay durchführen, der als Substrat für SpGad8 das Peptid „GRPRTSSFAEG“ bereitstellt. Es ist bekannt, dass dieses, auch als „crosstide“ bezeichnete, Peptid von AGC-Kinasen phosphoryliert wird (Cross *et al.*, 1995; Matsuo *et al.*, 2003). Dieses war im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

6.3.2 Phänotypische Untersuchungen von Δ gad8-Deletionsmutanten in Anwesenheit von Rapamycin

Die biochemischen Untersuchungen (Kapitel 5.2.2) deuten an, dass die Phosphorylierung und somit die Aktivität von SpGad8 nicht durch Rapamycin beeinflusst wird. Die phänotypischen Analysen der Δ gad8-Mutanten ergab eine leichte Rapamycin-Sensitivität (Abbildung 5.29). Dabei war der Wachstumsdefekt unter Stressbedingungen vergleichbar mit dem bei den Kontrollplatten. Die Beobachtung einer leichten Rapamycin-Sensitivität entspricht der Vermutung, dass Rapamycin seine Wirkung über andere Zielproteine ausübt.

In den hier gezeigten phänotypischen Analysen wurde der, bereits durch Matsuo *et al.* (2003) unter bestimmten Bedingungen (Hitzestress, 0,2 M KCl) gezeigte, ähnliche Phänotyp von Δ gad8-Mutanten und Δ tor1-Mutanten auch unter weiteren Stressbedingungen (3 mM H₂O₂,

0.02 M CaCl₂, 70 µg/ml Canavanin und 30 µg/ml Ethionin) gezeigt. Dadurch wird das bereits postulierte Signalmodul aus SpTor1-SpKsg1-SpGad8 bestätigt (Matsuo *et al.*, 2003).

6.4 Ist die Interaktion zwischen der leichten Kette des Clathrins und der TOR-Komplex 2-Komponente SpSte20/ScAVO3/mRictor konserviert?

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bauten auf die Identifizierung von SpClc1 als Bindepartner der HR1-Domäne von SpSte20 mittels des Zwei-Hybrid-Systems auf (Anja Lorberg, persönliche Mitteilung). HR1-Domänen wurden erstmals in dem Proteinkinase C-ähnlichen Säugerprotein mPRK1 als sich dreimal wiederholende homologe Region identifiziert (Palmer *et al.*, 1995). Die ersten beiden HR1-Domänen vermitteln die Bindung von mPRK1 an die kleine GTPase mRHOA (Shibata *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 1998; Maesaki *et al.*, 1999). Auch in *S. pombe* vermittelt die HR1-Domäne von den Proteinkinasen SpPck1 und SpPck2 deren Interaktion mit SpRho1 (Sayers *et al.*, 2000). In *S. cerevisiae* wurde ebenfalls die Bedeutung der HR1-Domäne von der Proteinkinase C ScPKC1 für dessen Interaktion mit ScRHO1 festgestellt (Schmitz *et al.*, 2002).

Die beobachtete Interaktion zwischen der HR1-Domäne von dem TOR-Komplex 2-Mitglied SpSte20 und SpClc1 wirft einige interessante Fragen auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Konservierung dieser Bindepartner in der Bäckerhefe und ein möglicher Einfluss auf die Lokalisation des TOR-Komplex 2 untersucht.

6.4.1 Interaktion von ScAVO3 und ScClc1

Um der Konservierung der SpSte20-SpClc1 Interaktion nachzugehen, wurde eine potentielle Interaktion der beiden homologen Proteine aus *S. cerevisiae* mittels Zwei-Hybrid-System untersucht. ScAVO3 stellt das homologe Protein zu SpSte20 dar. Es ist ebenfalls Mitglied des TOR-Komplex 2 in *S. cerevisiae*. ScCLC1 entspricht der leichten Kette des Clathrins in *S. cerevisiae*. In Abbildung 5.30 sind die Ergebnisse des Zwei-Hybrid-System dargestellt. Das Wachstum auf den YNBD leu⁻ trp⁻ ade⁻-Platten deutet eine Interaktion der HR1-Domäne von ScAVO3 und ScCLC1 bei beiden getesteten Transformanten an. Die beiden Stämme wachsen geringfügig besser als die Negativkontrollen. Dies kann daran liegen, dass hier nur die HR1-Domäne (As 7 bis As 183 von ScAVO3) getestet wurden. Möglicherweise sind für die Interaktion auch weitere Aminosäuren von Bedeutung. Um diese Annahme zu untersuchen, könnten größere Fragmente von SpAVO3 in einem Zwei-Hybrid-System auf eine Interaktion mit ScCLC1 analysiert werden. Dabei sollten verschiedene Fragmentgrößen gewählt werden,

die die für die HR1-Domäne kodierende Sequenz und unterschiedlich lange Bereiche der sich C-terminal anschließenden DNA-Sequenz beinhalten. Zusätzlich könnten das Vollängenprotein und ein *AVO3ΔHR1*-Konstrukt getestet werden.

In vorangegangenen Experimenten wurde versucht, die im Zwei-Hybrid-System beobachtete Interaktion von der HR1-Domäne von SpSte20 mit SpClc1 biochemisch zu bestätigen. In Ko-Immunpräzipitationen gelang dies möglicherweise aufgrund einer sehr transienten Bindung dieser Proteine nicht (Anne Dierkes, persönliche Mitteilung). Da die Clathrinhülle, an dessen Aufbau die leichte Ketten und die schweren Ketten des Clathrins beteiligt sind, einem ständigen Auf- und Abbau unterliegt, wären ebenso flüchtige Interaktionen mit anderen Proteinen denkbar (Woodward und Roth, 1978; Schook *et al.*, 1979; Keen *et al.*, 1979; Nandi *et al.*, 1982; Blank und Brodsky, 1987). Daher wurden Versuche mit dem membranpermeablen Crosslinker Dithiobis-succinimidyl-propionate (DSP, Pierce) durchgeführt, um eine möglicherweise transiente Interaktion von SpClc1 und SpSte20 in der Zelle zu stabilisieren. Entsprechende Vorversuche ergaben kein zufriedenstellendes Ergebnis und müssen grundsätzlich optimiert werden. Ko-Lokalisationsstudien mit SpClc1-CFP/GFP/RFP/YFP- und SpSte20-CFP/GFP/RFP/YFP-Fusionsproteinen oder elektronenmikroskopische Aufnahmen mittels Gold-markierter sekundärer Antikörper könnten die Ergebnisse des Zwei-Hybrid-Systems untermauern.

6.4.2 Bedeutung der HR1-Domäne für die Membranassoziation von SpSte20

Bisher sind zu einer möglichen Membranassoziation der TOR-Komplexe in *S. pombe* keine Daten publiziert worden. In Abbildung 5.31 A sind die biochemischen Fraktionierungsexperimente eines Stammes gezeigt, wobei die Proteinbanden das TOR-Komplex 2-Mitglied SpSte20 darstellen. Dieses Protein ist sowohl in der cytosolischen Fraktion („Ip hsp Überstand“), als auch in der Fraktion der Membran- und membranassoziierten Proteine („Ip hsp Pellett“) zu finden. Dieses gibt somit erstmalig einen Hinweis auf eine Membranassoziation von SpSte20 bzw. des TOR-Komplex 2 in *S. pombe*. In *S. cerevisiae* und Säugern ist bekannt, dass die Komplexe zumindest teil- oder zeitweise an der Membran lokalisiert sind. Wodurch die Lokalisation vermittelt wird, ist jedoch nicht vollständig geklärt. Es ist bekannt, dass in Säugern mTOR je nach Zellart und möglicherweise nach verschiedenen Versuchsbedingungen unterschiedlich lokalisiert ist. So ist mTOR in manchen Krebs-Zelllinien hauptsächlich im Zellkern anwesend (Zhang *et al.*, 2002), während andere Studien mTOR vor allem im Cytoplasma und am Golgi und ER vermuten (Liu und

Zheng, 2007). Eine weitere Arbeitsgruppe beschreibt, dass mTOR sich zwischen Cytoplasma und Zellkern hin- und herbewegt und so auch die Translation reguliert (Kim und Chen, 2000). Eine Membranassoziation der TOR-Proteine in *S. cerevisiae* wurde ebenfalls nachgewiesen und wird möglicherweise über deren „HEAT-repeats“ vermittelt (Kunz *et al.*, 2000). Aber auch hier unterscheiden sich die bisher publizierten Daten teilweise. So wird ScTor1 in einer Studie vor allem im Zellkern gesehen, wobei es bei Nährstoffmangel oder Rapamycin-Zugabe ins Cytoplasma exportiert wird (Li *et al.*, 2006). So wurde auch publiziert, dass ScTor1 diffus im Cytoplasma und dabei überwiegend nahe bei der Vakuolenmembran vorliegt. ScTor2 ist ebenfalls im Cytoplasma, aber auch an der Plasmamembran vorzufinden (Sturgill *et al.*, 2008). Eine neue Studie zeigt, dass der ScTOR-Komplex 1 an der Vakuolenmembran lokalisiert ist, während sich der ScTOR-Komplex 2 an einer bestimmten Region der Plasmamembran befindet. Diese Lokalisierung unterliegt einer gewissen Dynamik, die von lateralen Bewegungen geprägt ist. Dabei befindet sich der TOR-Komplex 2 in einem als MCT („membrane compartment containing TORC2“) bezeichneten Kompartiment (Berchthold und Walther, 2009).

In einem Zwei-Hybrid-System konnte eine Interaktion der HR1-Domäne von SpSte20 und SpClc1 gezeigt werden (persönliche Mitteilung, Fr. Dr. Anja Lorberg). Es gibt bislang keine Studien zu Clathrin in *S. pombe*. In Säugern und *S. cerevisiae* bilden die Proteine der leichten Kette des Clathrins - mCLC1 bzw ScCLC1 – zusammen mit den Proteinen der schweren Ketten des Clathrins – mCHC1 bzw. ScCHC1 – Triskelionstrukturen, die ihrerseits Clathrin-Vesikel bilden (Woodward und Roth, 1978; Schook *et al.*, 1979; Keen *et al.*, 1979; Kirchhausen und Harrison, 1981; Ungewickell und Branton, 1981; Nandi *et al.*, 1982; Blank und Brodsky, 1987). Die Clathrin-Vesikel nehmen bei der rezeptorvermittelten Endocytose eine zentrale Rolle ein, und sind aufgrund dieser Funktion zeitweise an der Membran assoziiert (Roth *et al.*, 1969; Rothman und Fine, 1980; Kinnon und Owen, 1983; Lemansky *et al.*, 1987). Da die, durch Clathrin vermittelte, Endocytose ein konservierter Prozess in Eukaryonten ist, könnte SpClc1 dabei in *S. pombe* eine ähnliche Bedeutung zukommen wie mCLC1 bzw. ScCLC1 in Säugern bzw. *S. cerevisiae*. So könnte die Bindung von SpClc1 an SpSte20 möglicherweise die Membranassoziation des TOR-Komplex 2 vermitteln. Um dieser Frage nachzugehen wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit einem Proteingemischextrakt eines Stammes, bei dem die HR1-Domäne von SpSte20 deletiert war, vorgenommen. Dabei ergab sich dasselbe Fraktionierungsmuster für das SpSte20 Δ HR1-Protein wie bei dem Volllängen-Protein (Abbildung 5.31 B). Bei einer Bedeutung der Interaktion von SpSte20 und SpClc1 für die Membranassoziation von SpSte20 bzw. dem TOR-Komplex 2, wäre ohne, die

Interaktion vermittelnde, HR1-Domäne eine Abnahme bzw. das Fehlen von SpSte20 in der Membranfraktion zu erwarten gewesen. Weitere Versuche und die Quantifizierung der Signalstärke von SpSte20 in den einzelnen Fraktionen sind notwendig, um eine endgültige Aussage über die Rolle der HR1-Domäne bei der Membranassoziation von SpSte20 treffen zu können. Möglicherweise sind andere Bereiche von SpSte20 für dessen Membranlokalisierung von Bedeutung.

Eine weitere Möglichkeit zu untersuchen, ob die Membranassoziation des TOR-Komplex 2 durch die Interaktion von SpSte20 und SpClc1 vermittelt wird, wären mikroskopische Lokalisationsstudien mit einem Stamm, bei dem ein z. B. ein SpSte20-GFP-Fusionsprotein vorliegt und das *clc1*⁺-Gen deletiert ist. Im Hinblick auf die Membranassoziation des TOR-Komplex 2 in *S. pombe* könnte, neben den bereits erwähnten Ansätzen, die Rolle von SpSin1, dem Homologen zu ScAVO3, untersucht werden, da die Membranassoziation des TOR-Komplex 2 in *S. cerevisiae* durch die C-terminale Domäne von ScAVO1 vermittelt wird (Berthold und Walther, 2009). Dies könnte wieder durch subzelluläre Fraktionierungen oder mikroskopischen Analysen geschehen.

Neben der möglichen Rolle von SpClc1 für die Lokalisation und Funktion des TOR-Komplex 2-Mitgliedes SpSte20, wäre es denkbar, dass SpSte20 für eine Rekrutierung von SpClc1 an die Membran notwendig ist. So könnte SpSte20 Einfluss auf die Endocytose nehmen. In *S. cerevisiae* wurde die Beteiligung von ScTOR2 an der Endocytose gezeigt. Dabei sind *tor2*-Mutanten nicht mehr in der Lage den α -Faktor-Rezeptor zu internalisieren (de Hart et al., 2003). Neben Sterolen, Sphingolipiden, bestimmten Kinasen, Rho-GTPasen und dem Aktinzytoskelett, ist somit ein funktionelles ScTOR2 für diesen ersten Schritt der rezeptor-vermittelten Endocytose notwendig (Munn, 2001; deHart et al., 2003; Symons und Rusk, 2003; Qualmann und Mellor, 2003). Dass die Zugabe von Rapamycin in *S. cerevisiae* die Endocytose verhindert, unterstreicht die Bedeutung der TOR-Proteine für diesen Prozess (Aronova et al., 2007). Untersuchungen zu dem Einfluss der TOR-Komplexe auf die Endocytose in *S. pombe*, auch im Hinblick auf die SpSte20-SpClc1 Interaktion, könnten daher interessante Einblicke in die TOR-Funktionen geben.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AD	Aktivierungsdomäne
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxisulfat
As	Aminosäuren
BD	Bindungsdomäne
bp, kb	Basenpaar, Kilobasenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl ₂	Calciumchlorid
D	Glukose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
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	Erdschwerebeschleunigung
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
Glu	Glutamat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
mc	„multicopy“
min	Minute
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
mRNA	„messenger RNA“
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer (Wellenlänge)
OD _{xnm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PCR	„Polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rap	Rapamycin

RNA	Ribonukleinsäure
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sc	„single copy“
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
sek	Sekunde
SDS	„Sodiumdodecylsulfat“ (Natriumdodecylsulfat)
TAP	“Tandem affinity purification” (Tandem Affinitäts Aufreinigung)
TBS	„Tris-buffered saline“
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
w/o	“without” (ohne)
Wt	Wildtyp
w/v	“weight per volume” (Gewicht pro Volumen)
YE	„Yeast extract“
YE5S	„Yeast extract“ mit Aminosäure- / Basenmix (Vollmedium <i>S. pombe</i>)
z. B.	Zum Beispiel

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

8 Anhang

8.1 Funktionalität der Stämme

Wie in Kapitel 4.3.22 beschrieben, wurde die Funktionalität der Stämme mittels Western Blot-Analyse (Daten nicht gezeigt), Tetradenanalyse (Daten nicht gezeigt), Wachstumskurven (Daten nicht gezeigt) und Tropftests überprüft. Ein Vergleich mit den Deletionsstämmen war bei den „Mip1-TAP“- und 3HA-TOR1-produzierenden Stämmen nicht möglich, da es sich sowohl bei *mip1*⁺ als auch bei *tor1*⁺ um essentielle Gene handelt. Ein Vergleich des Wachstums der Δ *gad8*-, Δ *sin1*-, Δ *ste20*- und Δ *tor1*-Stämme mit dem Wildtyp sind den Abbildungen 5.17 und 5.29 zu entnehmen. Die hier dargestellten Stämme haben jeweils das entsprechenden Fusionsproteine produziert und sich phänotypisch nicht vom Wildtyp unterschieden (Abbildung 8.1). Daher wurde mit diesen Stämmen weitergearbeitet.

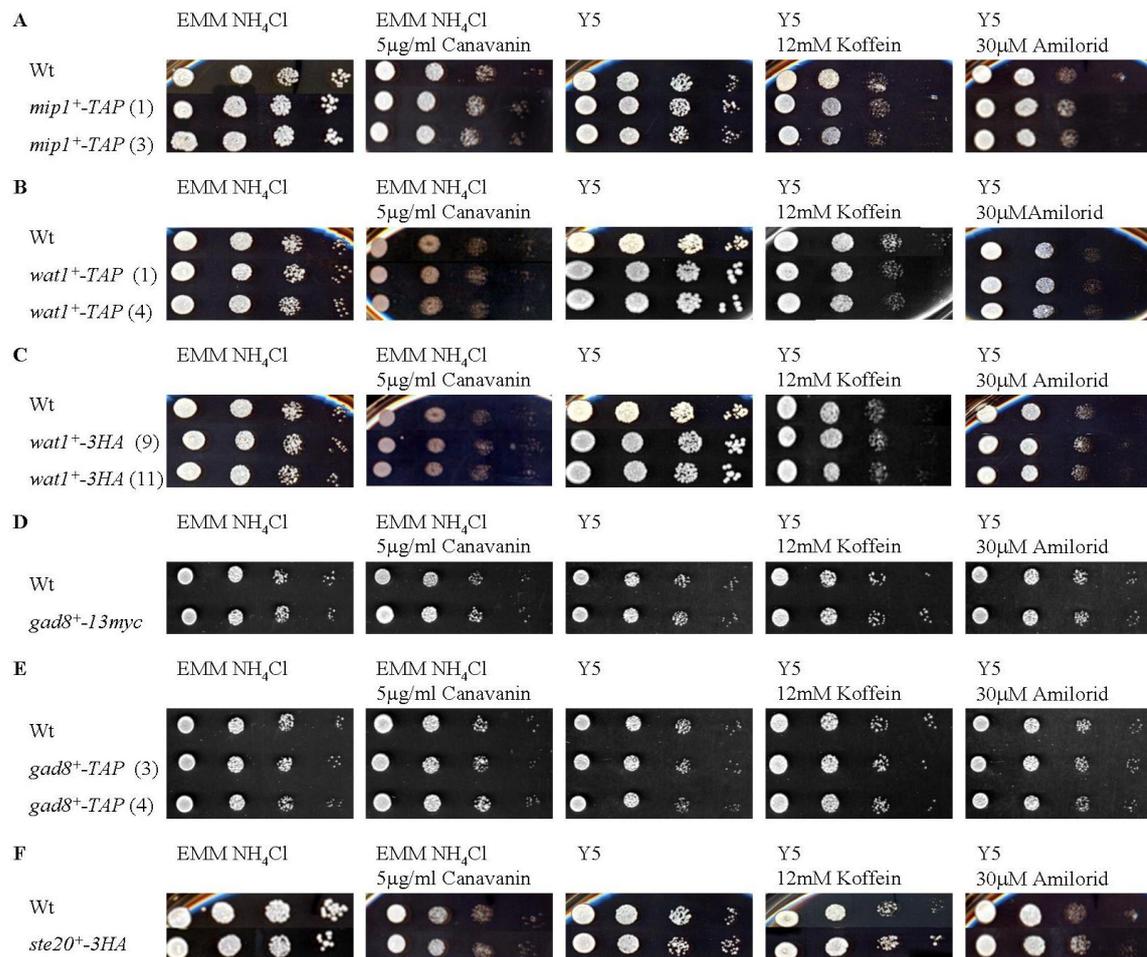


Abbildung 8.1 A-F: Phänotypische Überprüfung der hergestellten Stämme. Zum Vergleich wurde der Wildtyp (972) verwendet.

A: Test der Transformanten, die SpMip1-TAP produzieren (SPAL1-8 und SPAL1-10)

B: Test der Transformanten, die SpWat1-TAP produzieren (SPAL3-1 und SPAL3-4)

C: Test der Transformanten, die SpWat1-3HA produzieren (SPAL4-9 und SPAL4-11)

D: Test der Transformanten, die SpGad8-13myc produzieren (SPAL41)

E: Test der Transformanten, die SpGad8-TAP produzieren (SPAL42-3 und SPAL42-4)

F: Test der Transformanten, die SpSte20-3HA produzieren (SPGC1)

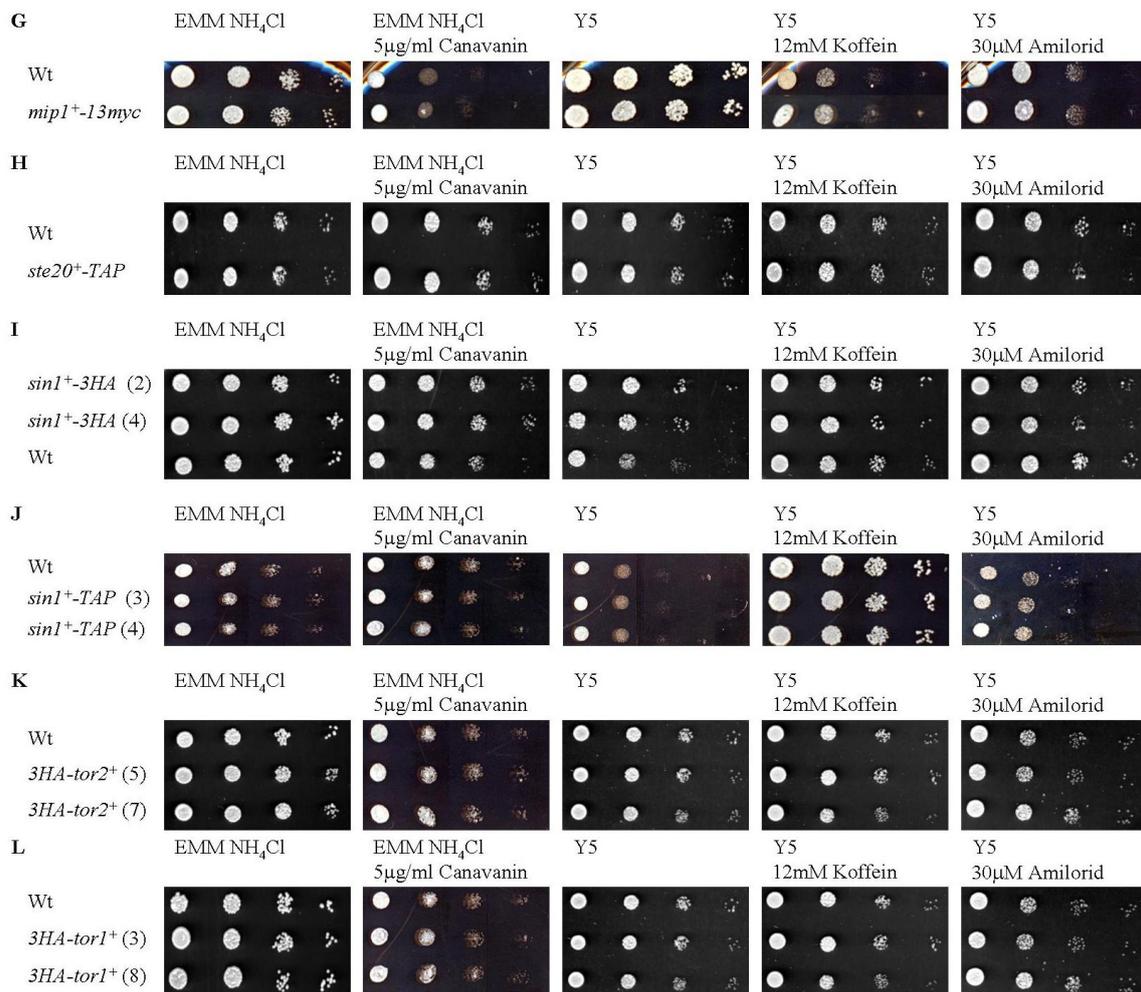


Abbildung 8.1 G-K: Phänotypische Überprüfung der hergestellten Stämme. Zum Vergleich wurde der Wildtyp (972) verwendet.

G: Test der Transformanten, die SpMip1-13myc produzieren (SPGC3)

H: Test der Transformanten, die SpSte20-TAP produzieren (SPGC4)

I: Test der Transformanten, die SpSin1-3HA produzieren (SPGC12-2 und SPGC12-4)

J: Test der Transformanten, die SpSin1-TAP produzieren (SPGC14-3 und SPGC14-4)

K: Test der Transformanten, die Sp3HA-Tor2 produzieren (SPGC17-5 und SPGC17-7)

L: Test der Transformanten, die Sp3HA-Tor1 produzieren (SPGC29-3 und SPGC29-8)

8.2 Sequenzvergleiche der TOR-Komplex-Mitglieder aus Hefen und Säugern

Im Folgenden sind die Sequenzvergleiche von den homologen Proteine der TOR-Komplexe aus Säugern, *S. cerevisiae* und *S. pombe* dargestellt (Abbildung 8.2-8.6).

ScTor1	MEPHEEQIWKS-KLLKAANNMMDMDRNVPLAPNLNVNMNMKNASRNGDEFGLTSSRFDG	59
ScTor2	MNKYINKYTPPNLLSLRQRAEGKHRTRKKLTHKSHSHDDEMSTTSNTDSNHNGPNDSGR	60
SpTor2	-----	
mTOR	-----MLGTGPAAATTAATTSSNVS-----	20
SpTor1	-----	
ScTor1	VVIGSN---GDVNFKP-----ILEKIFRELTSDYKEERKLASISLFDLLVSLEHELS	108
ScTor2	VITGSAGHIGKISFVDSLELDTTFSTLNLI FDKLKS DVPQERASGANELSTTLTSLAREVS	120
SpTor2	-----MKEFFPGLKSRNEEIRNKAANDLYEYVIAYSRELS	34
mTOR	-----VLQQFASGLKSRNEETRAKAAKELQHVTMELREMS	56
SpTor1	-----MEYFSDLKKNKESIQLAAADQLKEFVHSSTKELS	34
	*.. . : . : * : : **	
ScTor1	IEEFQAVSNDINNKI LELVHTKKTSTRVGAVLSIDTLISFYAYTERLPNETSRLAGYLRG	168
ScTor2	AEQFQRFNSLNKKIFELIHGFTSSEKIGGILAVDTLISFYLSTEELPNQTSRLANYLRV	180
SpTor2	GEALVQFNNDVNKYVYTLIHSTDPDLRLAGVTAINRLIDYEG---EDTTRITRFANYLR	91
mTOR	QEESTRFYDQLNHHIFELVSSDANERKGGILAIASLIGVEG---GNATRIGRFANYLRN	113
SpTor1	GESLARFNNDINRRI FELIHSHDSHERFGGILAIIGKLI EFESE--GDVTNLSRYANYLRM	92
	* . : : * . : . : : : * * . . * * . * * *	
ScTor1	LIPSNDEVMLRAAKTLGKLAVPGGTYTSDFVFEFEIKSCLEWLTASTEKNFSSSKPDHA	228
ScTor2	LIPSSDIEVMRLAANTLGRLLVPGGTLTSDFVFEVVRTCIDWLTTLTADNNS-SSSKLEYR	239
SpTor2	ILPGTDQKATVLAAKALGRLAVPGGALTSEFVNFEVKRALEWLQGERNENR-----	142
mTOR	LLPSNDPVVMEMASKAIGRLAMAGDTFTA EYVEFEVKRALEWL GADRNEGR-----	164
SpTor1	TLPSTDWHSMELSAKVLGHLAASGGTLAEFVFEVQRAFEWLQGDREQK-----	143
	: * . . * : : : : : * * : . : : * * : : *	
ScTor1	KHAALLIITALAENCPYLLYQYLNSILDNIWRALRDPHLVIRIDASITLAKCLSTLRNRD	288
ScTor2	RHAALLI IKALADNSPYLLYPVNSILDNIWVPLRDAKLI IRLDAVALGKCLTIIQDRD	299
SpTor2	RYAAVLILKELAKNTSTLIYAHIDSIFELLWHGLRDPKVTIRIASADALSEFLKIVRQRD	202
mTOR	RHAAVLVLRELAISVPTFFFQVQVFFDNI FVAVWDPKQAIREGAVAALRACLIILTTQRE	224
SpTor1	RMAAILI IKALAQNSPTLVYLYISEIFQNLWTGLRDPKPLIRETAADALGASLDVVCQRE	203
	: * * : * : : * * . . : : : . : : : : : : * . : * * : : * * : * :	
ScTor1	PQ--LTSQWVQRLATSCEYGFQV-----NTLECIHASLLVYKEILFLKDP-----	331
ScTor2	PA--LGKQWFQRLFQGC THGLSL-----NTNDSVHATLLVFRELLSLKAP-----	342
SpTor2	SS--IRLQWYTSILNEAQRGVAQ-----GSSDYIHGSLLVYRQLFLKAGM-----	245
mTOR	PKEMQKPQWYRHTFEEAEKGFDETLAKEKGMNRDDRIHGALLILNELVRISSMEGERLRE	284
SpTor1	AK--VQLQCFNEVLLQAEHGLRQ-----SSVEYLHGSLLAYKELFEKSGS-----	246
	. * . * . : : * : * * : : . .	
ScTor1	-----	
ScTor2	-----	
SpTor2	-----	
mTOR	EEMEITQQQLVHDKYCKDLMGFGTKPRHITPFTSFQAVQPQQSNALVGLLGYSSHQGLMG	344
SpTor1	-----	
ScTor1	-----FLNQVFDQMCLNCIAYENHKAKMIREKIYQIVPLLASFNP	371
ScTor2	-----YLRDKYDDIYKSTMKYKEYKFDVIRREVYAILPLLAADFDP	382
SpTor2	-----FMHERYREVSDIILQFRDHKDLLIRKTVTELIATLAAYNP	285
mTOR	FGTSPSPAKSTLVESRCCRDLMEEKFDQVCQWVLKCRNSKNSLIQMTILNLLPRLAAFRP	404
SpTor1	-----FIREHYTEFCDLALRLREHRDNSIRRCIVFLLPTLSEYNP	286
	: : : : : : : : * : : : : * : : *	

ScTor1	QLFAG-KYLHQIMDNYLEILTNA PANKI PHLKDDKPQILISIGDIAEYVGPDIAPYVKQI	430
ScTor2	AIFTK-KYLD RIMVHYLRYLKNIDMNAANNS--DKPFILV SIGDIAFEVGS SISP YMTLI	439
SpTor2	DEFVS-NYLHVCMLHLLNLLKKENV-----KMLAFATIGKVAVAITNSIIPYLDPI	335
mTOR	SAFTDTQYLQDTMNHVLS CVKKEKE-----RTAAFQALGLLSVAVRSEFKVYLPRV	455
SpTor1	KKFQQ-RYLD S FMVYLLSHIRKDK E-----KSLAFEAI GRIAMAVNEAMIPY LQNI	336
	* .** * * : : : : : * : :	
ScTor1	LDYIEHDLQTK-----FKFRKKFENEIFYCIGRLAVPLGPVLGKLLNRNILDLMFKCPLS	485
ScTor2	LDNIREGLRTK-----FKVRKQFEKDLFYCIGKLACALGPAFAKHLNKDLLNMLNCPMS	494
SpTor2	CDSIKESLKI H-----IRNKSASDAAI FQCISLLSIALGQAFS NYA-YDLFDLIFASGLS	389
mTOR	LDIIRAALPPKDFAHKRQKAMQVDATVFTCI SMLARAMGPGIQQDI-KELLEPMLAVGLS	514
SpTor1	LKVIRDTLTAK-----VREKTQYEKPVFECIGMLAAAVKLELLEDS-RSLLGLIFSCELS	390
	. * . * : : : * ** * : : : : : : : *	
ScTor1	DYMQET FQIL TERIPSLGPKINDELLNLVCSTLSGTPFIQPGSPMEIP SFSRERAREWRN	545
ScTor2	DHMQETLMILNEKIP SLESTVNSRILNLLSISLSGEKFIQSNQYDFNNQFSIEKARKSRN	554
SpTor2	EASIKESDLAHNIPPLLPVIQERLLDMLS KILSGRPFIPPGCPPQYVARSLKSS-----	444
mTOR	PALTAVLYDL SRQIPQLKDIQDGLLKM LSLVLMHK--PLRHPGMPKGLAHLASPLGTT	572
SpTor1	VHLRQALVKMAENIPPLLAPIQERLLNMV SQILTGKNFEIRTNDTYTPSFTNIYSAREPD	450
	. : : . ** * : : : * : : : :	
ScTor1	KNILQKTGESNDDNNDIKI I IQAFRMLKNIKSR-FSLVEFVRIVALSYIEHTDPRVRKLA	604
ScTor2	QSFMKKTGESNDDITDAQILIQCFKMLQLIHHQ-YSLTEFVRLITISYIEHEDSSVRKLA	613
SpTor2	KSASLKTGFPPND-----VYILALKVLGNFDFSGYILNEFVKDCVVVYLENNDEVRKTA	499
mTOR	LPEASDVGS-----ITLALRTLGSFEFEGHSLTQFVRHCADHFLNSEHKEIRMEA	622
SpTor1	Q-RSKSTES-----IILALETLGT FNFTGYSLSIFIQESVLSYLENDNSEIRIAA	499
	. . : : * : . * * : : . : : . * *	
ScTor1	ALTSCIEIYVK-----DNICKQTSLSHSLNTVSEVLSKLLAITIADPLQDIRLEVLKLN NPC	659
ScTor2	ALTSCDLFIK-----DDICKQTSVHALHSVSEVLSKLLMIAITDPVAEIRLEILQHLGSN	668
SpTor2	SITCSQLFAR-----DPILSQTSDHAIQVVAEVLEKLLTVGICDTPDIRLTVLNSLDSR	554
mTOR	ARTCSRLLTPSIHLISGHAVVVSQTAVQVADVLSKLLVVGITDPDPDIRYCVLASLDER	682
SpTor1	ARTCCQVFAR-----DPICRKTNPLAVESVAEVLEKLLTLGIADSDPKIRETVLSLLDER	554
	: * . : : . : : * : * * * : * * . ** : * *	
ScTor1	FDPQLAQPDNLRLLFTALHDESFNIQSVAMELVGR LSSVNPAYVIPSIRKILLELLTKLK	719
ScTor2	FDPQLAQPDNLRLLFMALNDEIFGIQLEAIKIIGRLSSVNPAYVVP SLRKTLELLTQLK	728
SpTor2	FNKHLAQADKIRLLFIAINDENFAVRESALRIIGRLNVNPA YVMPYLRKIMLKTTLTILD	614
mTOR	FDAHLAQAE NLQALFVALNDQVFEIRELAICTVGR LSSMNP AFVMPFLRKM LIQILTELE	742
SpTor1	FDRHLAHPDNIRCLFIALNDEVFSIREIAI I IIGRLALYNPAHVMP SLRKTIIQLLSDME	614
	* : * * : : : * * : * : * : * * * * * * * * * * * : : :	
ScTor1	FSTSSREKEETASLLCTLRSSKDVAKPYIEPLLNVLLPKFQDTSS----TVASTALRTI	775
ScTor2	FSNMPKKKEESATLLCTLINSDEVAKPYIDPILDVILPKQDASS----AVASTALKVL	784
SpTor2	YSTIIRTKEENAKLLCLLIAAAPRLIESHVEPILQILLPKAKDSSS----IVAASIVNSL	670
mTOR	HSGIGRIKEQSARMLGHLVSNAPRLIRPYMEPILKALILKLDKDPDPNPGVINNVLATI	802
SpTor1	YSGNSRQKEESAQLLKLVS KARTLIKPYIQSIIHVILPKAADTSP----GVSSAIISAL	670
	. * : * * : * * : : : : : : : : * * * * * * : : :	
ScTor1	GELSVVGGEDMKIYLK-DLFLPIIKTFQDQNSNFKREAAALKALGQLAASSGYVIDPLLDY	834
ScTor2	GELSVVGGKEMTRYLK-ELMPLIINTFQDQNSNFKRDAALTTLGQLAASSGYVVGPLLDY	843
SpTor2	GEICQISGEVIVPFIK-DLMP LIIEALQDQSSPIRRAAALKALGNLSSSTGYVIDPYIEF	729
mTOR	GELAQVSGLEMRKWVD-ELFIIIMDMLQDSSLLAKRQVALWTLGQLVASTGYVVEPYRKY	861
SpTor1	GELASVEGEDMPVDVRSFMK LILVNLQDQSS TLKRLASLKLKRCGRSGYVIQPYLDY	730
	** : . : * : : : : : : * * * * * * * * * * * : :	
ScTor1	PELLGILVNI LKTENSQNIRRQTVTLIGILGAIDPYRQKE-----REVSTTDI	883
ScTor2	PELLGILINILKTENNP HIRRGTVRLIGILGALDPYKHRE-----IEVTSNSKS	892
SpTor2	PSLLDILIGITKTEQDITIRRETIKLIGTLGALDPNRHRV-----LEKG-TEKV	777
mTOR	PTLLEVLNLFKTEQNQGT RREAIRV LGLL GALDPYKHKVNI GMIDQSRDASAVSLSESK	921
SpTor1	PPLLGALIGILQSEQPTPIRREVLRTLGVLGALDPYTYLT-----TEEVSD	776
	* ** * : : : * * : : * * * * * * * * * * * .	
ScTor1	STEQNAPPIDIALLMQGMSPSNDEYYTTVVIHCLLKILKDP SLSYHTAVIQAIMHIFQT	943
ScTor2	SVEQNAPSIDIALLMQGVSPSNDEYYPTVVIHNLMKILNDPSLSIHHTAAIQAIMHIFQN	952
SpTor2	VPEQKNIPDISLLMSGIGPSSDEYYPTV VITALMSILKDP SLTIHHTAVIQAVMYIFKT	837
mTOR	SSQDSSDYSTSEMLVNMGNLPLDEFYPAVSMVALMRIFRDQSLSHHHTMVVQAITFIFKS	981
SpTor1	DLQSSHNNAHGVPQISAAQYPSLENYAMVAVVTLIGILKDDSSLSMHSSVVQAVMHICSQ	836
	. . . : . * * * : * : * * * * * * * * * * * .	

ScTor1	EISALINESYNRAYSVIVRTQIITEFEEI IKYKQLPPNSEKKLHYQNLWTKRLLGCQKNV	1581
ScTor2	ELSALVNESYNRAYNVVRAQIIAELEEI IKYKQLPPNSEKKLHYQNLWTKRLLGCQKNI	1588
SpTor2	ELTALVGESYNRAYSVAVRVQMLSELEEI IITYKKAEDKPEVREMIKKTWVRRLKGCQRNV	1483
mTOR	ELTAMAGESYSRAYGAMVSCMHLSELEEVIQYKLVPERR---EIIRQIWWERLQGCQRIV	1630
SpTor1	DLSSII GESYNRAYGIMVKSQMLSELEEI IDYKKNMQYENNLDSLKKTWRKRLEGCQKNV	1480
	: : : : . * * * . * * * . * : : : : * * * : * * * : : :	
ScTor1	DLWQVRVLRVRSVLVIKPKQDLQIWIKFANLRCRKSGRMLANKALNMLLEGGNDPSLPNT-F	1640
ScTor2	DVWQRILRVRSVLVIKPKEDAQVRIKFANLRCRKSGRMALAKKVLNLTLEETDDPDHPNT-A	1647
SpTor2	DVWQRMLRIRSLVISPRDNMEMWIKFANLRCRKSGRISLAKKSLNLLLEDDENLDNSLV-L	1542
mTOR	EDWQKILMVRSLVSPHEDMRTWLKYASLCGKSGRLALAHKTLVLLLLGVDPSPRQLDHP-L	1689
SpTor1	DVWHNTLRFRALVLS PQDSPMVIKWLADLCRRSDRLKLSNQCLTYLMGRDPSNAYPLDSL	1540
	: * : . * . * : * * : * : : . : * * . * * : * : * : * : : * * :	
ScTor1	KAPPP-VVYAQLKYI WATGAYKEALNHLIGFTSRLAHDGLDPNNMIAQSVKLSSASTAP	1699
ScTor2	KASPP-VVYAQLKYLWATGLQDEALKQLINFTSRMAHDGLDPNNMIAQSVPPQSKRVPR	1706
SpTor2	KKTHPSIVYANLKFVAVDDKRKALNSMQEFTSQLISDINVDP-ALFVQSTSVNTKQSR	1601
mTOR	PTVHPQVTYAYMKNMWKSARKIDAFQHMQHFFVQTMQQQA---QHAIATED-----QQ	1738
SpTor1	KLLNPHVVYTYLKYLWATDQKNIAVSELEEFSTYLSKX---GYKMGDSSKLVLDILASS	1597
	* : . * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	
ScTor1	YVEEYTKLLARCFLKQGEWRIATQPNWRNTNPDAILGSYLLATHFDKNWYKAWHNWALAN	1759
ScTor2	HVEDYTKLLARCFLKQGEWRVCLQPKWRLSNPDSILGSYLLATHFDNTWYKAWHNWALAN	1766
SpTor2	EIQYYFHLARCYHKQGWQOEIENNWSGSEFDGVLQSYMYATQFDSKWYKAWHSWALAN	1661
mTOR	HKQELHKL MARCFLKLGWQLNLQG-INESTIPKVLQYYSAATEHDRSWYKAWHAWVMN	1797
SpTor1	VSSEERSFLARCFHKLKWKSLQDSVNVQESVRDILNCYFYATLFDKSWYKAWHSWALAN	1657
	. : * * * : * * * : * : . : * * * * * . * * * * * * * : * :	
ScTor1	FEVISMVQEETKLNKGKNDDDDDTAVNNDNV-----RIDG	1794
ScTor2	FEVISMLTSVSKKKQEGSDASSVTDIN-----EFDN	1797
SpTor2	FEAVKFLQES-----	1671
mTOR	FEAVLHYKHQNQARDEKKKLRHASGANITNATTAATTAATATTASTEGSNSESEAESTE	1857
SpTor1	FEVVGYYEQTEHG-----	1670
	** . :	
ScTor1	SILGSGSLTINGNRYPLELIQRHVVPKAIKGFHHSISLLETSCLODTRLRLTLFNFGGIK	1854
ScTor2	GMIGVNTFDAKEVHYSSNLIHRHVI PAIKGFHHSISLSESSSLQDALRLLTLWFTFGGIP	1857
SpTor2	-----EEQIPSAAYEQYIIPAVKGFHHSIALSKGN-LQDTRLRLNLWFKFGNNS	1719
mTOR	NSPTPSPKQKVTEDLSKTLMLYTPAVQGFHHSISLARGNNLQDTRLRVLTLWFDFYGHWP	1917
SpTor1	-----VTQDMYE---QYIVPAIKGFHHSVNLQKNSLQDILRLNLWFKFGHHS	1716
	. : * * * : * * * : * : . : * * * * * . * * * * * * * : * :	
ScTor1	EVSQAMYEGFNLMKIENWLEVLVLPQLISRIPHQPDPVTSNLSLSDLGKAHPQALVYPLT	1914
ScTor2	EATQAMHEGFNLIQIGTWLEVLVLPQLISRIPHQPNQIVSRSLSDLGKAHPQALVYPLM	1917
SpTor2	NVINTLNVGISTVNIDIWLDVIPQLIARIHASSLSVRKSVHQLSDVGRAHPQALVYPLT	1779
mTOR	DVNEALVEGVKAIQIDTWLQVIPQLIARIDTPRPLVGRILHQLLTDIGRYHPQALIYPLT	1977
SpTor1	DVAAAIVEGFSNVPMDTWLEVIPQLIARIHTSSSSVRASVHQLSDIGRVHPQALVYSLT	1776
	: . : : * . : : * * : * * * * * . * : * * * * * : * * * * * * * :	
ScTor1	VAIKSESVSRQKAALSII EKIRIHSVPLVNQAEVLSHELIRVAVLWHELWYEGLEDASRQ	1974
ScTor2	VAIKSELSRQKAALSII EKMRIHSVPLVDQAEVLSHELIRMAVLWHEQWYEGLEDASRQ	1977
SpTor2	VAAKSQSARQNAALAIMDSLKTHSPRLVEQARLVSHELIRAAILWHEQWHEGLEEASRL	1839
mTOR	VASKSTTTARHNAANKILKNMCEHSNTLVQQAMMVSEELIRVAILWHEMWHEGLEEASRL	2037
SpTor1	VSSKSTNPQQKHSAKSIMDSMLSHSDTLVRQALLVSQELIRVAILWHELWYEGLEEASQA	1836
	* : * * . : : : * * : * : : * * * * * : * * * * * * * : * * * * * * :	
ScTor1	FFVEHNIEKMFSTLEPLHKLGNPQTLSEVSVFQKSFGRDLNDAYEWLNNYKSKDINNL	2034
ScTor2	FFGEHNTEKMFAALEPLYEMLKRGPELREISFQNSFGRDLNDAYEWLNNYKSKDVSNL	2037
SpTor2	YFGDHNIEGMFAVLRPLHEMLERGPETLREISFQQAQFGRDLVEARDCCIRFEQTDISDL	1899
mTOR	YFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKSGNVKDL	2097
SpTor1	YFSDHDSLMIDIVKPLHETLEKGPSTLSEISFAQTFGYDLRKARSYQKFLQDGDPTL	1896
	: * : : . * : : * * : : . * * * * * : : * * * * * . * : : : : * * :	
ScTor1	NQAWDIYVFRKITRQIPQLQTLDLQHVSPQLLATHDLELAVPGTYFPG-KPTIRIAKF	2093
ScTor2	NQAWDIYVFRKIGKQLPQLQTLLELQHVSPKLLSAHDLELAVPGTRASGGKPIVKISKF	2097
SpTor2	NQAWDLYYQVFKKIRKQLPQLTTLDLQVSPKLLHVHDELELAVPGTYVSG-KPVIRIVKF	1958
mTOR	TQAWDLYYHVFRRIKQLPQLTSLELQVSPKLLMCRDLELAVPGTYDPN-QPIIRIQSI	2156
SpTor1	NQSWDLYYQVFRRIKQLPRIKHELELQVSPKLLDACDLELAVPGTYGHN-KPVIRISHF	1955
	. * : * * * * * : * * : : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * : * : * * :	

ScTor1	EPLFSVISSKQRPRKFSIKGSDGKDYKYLKGHEDIRQDSLVMQLFGLVNTLLKNDSECF	2153
ScTor2	EPVFSVISSKQRPRKFCIKGSDGKDYKYLKGHEDIRQDSLVMQLFGLVNTLLQNDAEFC	2157
SpTor2	YPTFNVITSKQRPRRLSIKSDGKDYQYVLLKGHEDIRQDERVMQLFGLCNNLLADPETF	2018
mTOR	APNSLQVITSKQRPRKLTLMGSGNHEFVLLKGHEDLRQDERVMQLFGLVNTLLANDPDSL	2216
SpTor1	HHTFEVSISSKQRPRRLTIHGS DGKDYQYVLLKGHEDLRQDERVMQLFGLCNTLLTTDSETF	2015
	: . ** : ***** : : * : * : : : : ***** : * * . ***** * . * * * . :	
ScTor1	KRHLDIQQYPAIPLSPKSGLLGWVNSDTFHVLI REHRAKKIPLNIEHWVLMQMAPDYE	2213
ScTor2	RRHLDIQQYPAIPLSPKSGLLGWVNSDTFHVLI REHREAKKIPLNIEHWVLMQMAPDYD	2217
SpTor2	KRLLSIQRYPVPIPLSPDSGLLGWVLDSDTLHVLIRDYRESRKILLNIEHRLIIQMAPDYD	2078
mTOR	HLTLMQKVEVFEHAVNNTAGDDLAKLLWLKSPSEVWFDRRTNYTRSLAVMSMVGYILGL	2276
SpTor1	KRRLNIERYTVIPLSPNSGLLGWVPHSDTLHFLIKEFRSKRNILLNLEHRMMLQMAPDCD	2075
	: : * . * : * . * * * . * * * : * * * * . * * : * * * * * : : : * * * * * :	
ScTor1	NLTLQKIEVFYTYALDNTKGQDLYKILWLKSRSSSETWLERRTTYTRSLAVMSMTGYILGL	2273
ScTor2	NLTLQKVEVFYTYALNNTGQDLYKVLWLKSRSSSETWLERRTTYTRSLAVMSMTGYILGL	2277
SpTor2	RLLTLQKVEVFYTYALSTGQDLYRVLWLKSRSSSEAWLNRRNTNYSRTLAVMSMVGYILGL	2138
mTOR	HLTLMQKVEVFEHAVNNTAGDDLAKLLWLKSPSEVWFDRRTNYTRSLAVMSMVGYILGL	2336
SpTor1	SLTLQKLEVFYVMANTDGYDLYHVLWLKSRSSSEAWLDRRTSYTQSLAVMSMVGYILGL	2135
	* * * : * * * * * : : . * * * * * : : * * * * * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * :	
ScTor1	GDRHPSNMLDRLTGKVIHIDFGDCFEAAILREKYPEKVPFRLTRMLTYAMEVSGIEGSF	2333
ScTor2	GDRHPSNMLDRLTGKVIHIDFGDCFEAAILREKFPKVPFRLTRMLTYAMEVSGIEGSF	2337
SpTor2	GDRHPSNMLDRYTGNIIHIDFGDCFEVAMHREKFPKVPFRLTRMLVNAMEVSGIEGTF	2198
mTOR	GDRHPSNMLDRLSGKILHIDFGDCFEVAMTREKFPKVPFRLTRMLTNAMEVTGLDGNV	2396
SpTor1	GDRHPSNMLMDRYSKIIHIDFGDCFEVAMHREKFPKVPFRLTRMLNAMEVSGIQGT	2195
	* * * * * * * * * : * * : : * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * :	
ScTor1	RITCENVMRVLDRDNKESLMAILEAFALDPLIHWGFDLPPQKLTETGTIPLPLINPS----	2389
ScTor2	RITCENVMKVLDRDNKGSMAILEAFADPLINWGFDPKTKIEEETGIQLPVMNAN----	2393
SpTor2	RITCEHVMRVLDRTNKESVMAVLEAFVYDPLINWRLAPAYSPSIDKQSNENPTLLG----	2254
mTOR	RITCHTVMEVLRHKDSVMAVLEAFVYDPLLNWRLMDTNTKGNKRSRTRTDSYSAGQSVE	2456
SpTor1	KITCELVMRVLRSNTESLMAVLEAFVYDPLINWRLMTKSSFGASTTLRPTSSSVE-----	2250
	: * * * . * * . * * * : . * : * * : * * * * . * * * : * * : * * : . . .	
ScTor1	-----ELLR--KGAITVEEAAANMEAE--QONETKNARAMLVLRITDKLTGNDIKRF	2437
ScTor2	-----ELLS--NGAITVEEVQVRVENE--HKNAIRNARAMLVLRITDKLTGNDIRRF	2441
SpTor2	-----ETIDGLHRKRLNEEGITLEER--QKPEILNQRAITVLNRVSNKLTGRDFKPQ	2304
mTOR	ILDGVELGEPAAHKKTGTTVPESIHSEFIDGLVKPEALNKKAIQIINRVRDKLTGRDFSHD	2516
SpTor1	-----EKGRSYTHRARHADYAALSETNGVNAEGLNERSIQVLKRVSNKLTGKDFDLK	2302
	* . . . : * : : : * * * : * * * * * :	
ScTor1	NELDVPEQVDKLIQQATSIERLCQHYIGWCPFW	2470
ScTor2	NDLDVPEQVDKLIQQATSVENLCQHYIGWCPFW	2474
SpTor2	QQLDVPSQVEKLIQATSIENTLCLCYIGWCSFW	2337
mTOR	DTLDVPTQVELLIKQATSHENLCQCYIGWCPFW	2549
SpTor1	EQLPVKAQVEKLIQQATAPENLCRCYVWCSFW	2335
	: * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * :	

Abbildung 8.2: Sequenzvergleich der TOR-Komplex-Mitglieder mTOR aus Säugern und ScTOR1 bzw. ScTOR2 aus *S. cerevisiae* und den homologen Proteinen SpTor1 bzw. SpTor2 aus *S. pombe*. Die Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW2 durchgeführt. Dabei zeigt „ “ (ein Leerzeichen) keine Übereinstimmung, während „.“ bzw. „:“ die Übereinstimmung von zwei oder mehreren untersuchten Proteinen darstellt. Ist eine Aminosäure in allen Fällen identisch, so wird dieses mit einem „*“ angezeigt.

ScKOG1	----MPEIYGP-----QPLKPLNTVM	17
SpMip1	MNDRISEVSGSSRRARRSVLSYGTETGSDRYTENSNIATENGVDTASSMIDGIQSGFPQP	60
mRAPTOR	-----MESEMLQSP	9
	.	
ScKOG1	RHGFEEQYQSDQLLQSLANDFIFYFDDKRHKTNGNPIPEEDKQRDVNRYYQPITDWKIMK	77
SpMip1	RHGFEEYNNAEYINMLEQVFMYYTDRHRG---VISKNAEP-----TETIHDWR-MR	111
mRAPTOR	LLGLGEEDEADLTDWNPLAFMKRHRCEKIEG-----SKSLAQS-----WR-MK	52
	* : * : : * * : : . . . : * : *	

ScKOG1	DRQKTVSAALLLCLNLGVDPPDVMKTHPCARVEAWVDPLNFQDSKKAIEQIGKNLQAQYE	137
SpMip1	ERLKTVSAALLLVCLNIGVDPPDVIKPNPAAKYECWIDPFSLPAS-KALEAIGKNLQQQYE	170
mRAPTOR	DRMKTVSVALVLCNLVGVDPDVKTTPCARLECWIDPLSMGPQ-KALETIGANLQKQYE	111
	:* ***.**::***:*****:* . *.*: *.**::: . **:* ** ** ** **	
ScKOG1	TLSLRTRYKQSLDPCVEDVKRFCNSLRRTSKEDRILFHYNHGHGVPKPTKSGEIWFVFNRY	197
SpMip1	TLSMRTRYRHYLDPAIEEVKLLCIGQRNAKEERILFHYNHGHGVPMPPTASGEIWFVFNKNY	230
mRAPTOR	NWQPRARYKQSLDPTVDEVKLLCTSLRRNAKEERVLFHYNHGHGVPRTVNGEVVWFNKNY	171
	. . *:**:: *** ::**:* . **:**:**:***** ** .**:*:**:.*	
ScKOG1	TQYIPVSLYDLQTLWGAPCIFVYDCNSAENILINFQKFVQKRKIK----DDEEGNHDVAAP	253
SpMip1	TQYIPVSLYDLQSWLGAPCIYVYDCSAAGNIIVNFNRFQAEQRDK----EALRIAKQNPV	286
mRAPTOR	TQYIPLSIYDLQTMGSPSIFVYDCSNAGLIVKSFQFALQREQELEVAAINPNHPLAQM	231
	*****:*:**:**:**:*.*:**:*** . * .*: .**:* . * : . : .	
ScKOG1	SPTSAYQDCFQLASCTSDLELLMSPPELADLFSCCLTCPIEISIRIFLMQSPKDKSKYKI	313
SpMip1	LAMPSHTSCIQLAACGPKETLPMNPDLPADLFTSCLTSPIEISVRWYVLQNPFPN---KL	343
mRAPTOR	PLPPSMKNCIQLAACEATELLPMIPDLPADLFTSCLTTPIKIALRWFCMQKCVSLVP-GV	290
	. : .*:**:* . * * * *:**:**:*** **:**:* : :*. . :	
ScKOG1	FFENSTSNQPFPGDSKNSFKSKIIPNVNIPGMLSDRRTPLGELNWIIFTAITDTIAWTSRPR	373
SpMip1	NLN-----MLLKIPGRLQDRRTPLGELNWIIFTAITDTIAWNVFKH	384
mRAPTOR	TLD-----LIEKIPGRLNDRRTPLGELNWIIFTAITDTIAWNVLPD	331
	: : :*** * .*****:*** **:**:* : :*	
ScKOG1	LFKKLFRHDLMIAALFRNFLLAKRIMPWYNCHPVSDPELPDSITTHPMWKSVDLAMDVLE	433
SpMip1	LFRRLLFRQDLMVAALFRNFLLAERIMLVHSCHPQSSPELPP-THDHPMWNVDLADNCL	443
mRAPTOR	LFQKLFQDLLVASLFRNFLLAERIMRSYNCTPVSSPRLPP-TYMHAMWQAWDLAVDICL	390
	:	
ScKOG1	TKIVIDLKNAPPATALESQMILQQQETLQNGGSSKSNQDQTKAGSIQTQSRFAVANLSTM	493
SpMip1	SQLPDMLEAE-----SKGIAYEYKH-----	463
mRAPTOR	SQLPTIIEEG-----TA--FRH-----	405
	::: :. * :	
ScKOG1	SLVNNPALQSRKISISLQSSQQQLQQQQQQQOFTGFFEQLTAFELWLKYASNVRHPPEQ	553
SpMip1	-----STFFSEQLTAFEVWLSQGLISRKPPDQ	490
mRAPTOR	-----SPFFAEQLTAFQVWLTMGVENRNPPEQ	432
	: ** ::**:**:**. . **:**:*	
ScKOG1	LPIVLQVLLSQVHRIRALVLLSRFLDLGPWAVYLSLSIGIFPYVLKLLQSPAPKPIV	613
SpMip1	LPLVLQVLLSQVHRLRALIILSKFLDLGVAVDLALSIGIFPYVLKLLQSPAIELKPVLV	550
mRAPTOR	LPIVLQVLLSQVHRLRALDLGRFLDLGPWAVSLALSIGIFPYVLKLLQSSARELRPLLV	492
	:	
ScKOG1	FIWARIMSIDYKNTQSELIKEKGYMYFVTVLVDPDWGVNGMSATNGSAMINSGNPLTMTAS	673
SpMip1	FIWARILAVDDS-CQADLLKDNQYGYFVQILNPNS-----SIFPS	589
mRAPTOR	FIWAKILAVDSS-CQADLVKDNHGYFVSLVADPY-----MPA-	529
	***:*:**:** . *:**:**:**: ** : *	
ScKOG1	QNINGPSSRYERQQGNRTSNLGHNNLPFYHSNDTTDEQKAMAVFVLASFVRNFPQGQKN	733
SpMip1	SNIS-----EHRAMCAFILSVFCRFPQGQLA	616
mRAPTOR	-----EHRMTAFILAVIVNSYHTGQEA	552
	*:**:* .**:**: : . : **	
ScKOG1	CFSLELVNKLCFYIDNSEIPLLQWCVILGLLFDNPLNRFVCMNTGAVEILLKSLKDP	793
SpMip1	CLNPQVLS-HCLSHLNSPDSLRLQWACLCSQLWENYSEAKWSGTRDNAHVKLAEIIVDS	675
mRAPTOR	CLQGNLIA-ICLEQLNDPPLRLQWVAICLGRIWQNFDSARWCVRDSAHEKLYSLSDP	611
	*. . : : * . * . ***** : . : : : : . * * . : *	
ScKOG1	VPEVRTASIFALKHFISGFQDAEVLRLQQEFEEQYQLLHSQLQHLQNSHLQQQQSQQQ	853
SpMip1	VPEVRASVLTAFVTFGL-----FPEKTEEVVAVETYIA-----	708
mRAPTOR	IPEVRCAAVFALGTFVG-----NSAERTDHSTTIDHNVA-----	645
	:***: : : * : * . * : . : :	
ScKOG1	QQHLEQQQMKIEKQIRHCQVMQNLQLEVIDLRKLRQEIGNLISILPLINDGSSSLVRKELV	913
SpMip1	-----IAALAALSDASPLVRHEL	727
mRAPTOR	-----MMLAQLVSDGSPMVRKELV	664
	: . * . * . **:**:**	

ScKOG1	VYFSHIVSRYSNFFIVVFNDDLLEEKLEKSDINTRN-----TSDKYSVSQGS	962
SpMip1	IFLSHFVNYKKQLMVVAYESSLADI--LEKKNHN-----SISAST	766
mRAPTOR	VALSHLVVQYESNFCVALQFIEEEKNYALPSPATTEGGSLTPVRDSPCTPRLRSVSSYG	724
	: : ** : * . * . . : . * . : : : . . . * : *	
ScKOG1	IFYTVWKSLLILAEDPFLENKELSKQVIDY----ILLELSAHKELGGPFVMEKFLKRS	1018
SpMip1	IYETVWQAVLVLAADPSIEISLAAEAIINY----VYQSMNLN-SELRESFLAFLQLQHPAL	821
mRAPTOR	NIRAVATARSLNKSLQNLSTLSEESGGAVAFSPGNLSTSSSASSTLGSPENEEHILSFETI	784
	: * : : : . . : : : : : . . * . : :	
ScKOG1	SKAHQTGKFGFNSSQV-----QFVKSSLRSFSPNERVDN---NAFKKEQQQH	1062
SpMip1	HKASLSKDTDTNS-----VTSDPKPHPFVPSVSE---NKILNRS---	857
mRAPTOR	DKMRRASSYSSLNLSLIGVSFNVSQYTIQIWRVLLHLAADPYPEVSDVAMKVLNSIAYKATVN	844
	* : . . . : : . . . * * : .	
ScKOG1	DPKISHPMRTSLAK-----LFQSLGFSESNDSQSSNTSMKSHTSKKGPGLYLLNG	1116
SpMip1	-----FSLTR-----SLKGLALS LAGSDR-----ASELLSLNGENKPAESNLNHL	897
mRAPTOR	ARPQRVLDTSSLTQSAPASPTNKGVHIHQAGGSPPASSTSSSSLTNDVAKQFVSRDLPSG	904
	** : : : : : : : : : : : * *	
ScKOG1	-----NNNIYP-----TAETPRFRKHTEPLQLPLNSSFLDYSR	1149
SpMip1	-----TSAKVP-----GPPAFNELEYQSELDMP LTSYLF DWSR	930
mRAPTOR	RPGTTGPAGAQYTPHSHQFPTRTRKMF DKGPEQTADDADDAAGHKSFISATVQTGFCDWSA	964
	. * : : : : : : : : * *	
ScKOG1	EYFQEPQMKKQEADEPGSVEYNARLWRRNRNETIIQETQGEKKLSIYGNWSKKLISLNNK	1209
SpMip1	KYFTEPQMRPNEDDEPGSICYNQRLWRRNRNEKLIYRTRPLAEYSTNGRWNQQLMTFNNT	990
mRAPTOR	RYFAQPVMKIPEEHDLSEQIRKEREWRF LNSRVRRQAQQVIQKGIT-RLDDQIFLNRNP	1023
	. ** : * * : * . : * : * * * * . : : : : . . . : : . *	
ScKOG1	SQPKLMKFAQFEDQLITADDRSTITVFDWEKGTLSKFSNGTFFGKVTDLKLINEDDSA	1269
SpMip1	IAPRKLMFHQFEDQLITLGDKDIIQVVDWRRNRCLNSFKTSASATTNVDMQLLNEDDVA	1050
mRAPTOR	GVPSVVKFHPFT-PCIAVADKDSICFWDWEKGEKLDYFHNGNPRYTRVTAMEYLNQDCS	1082
	* : * * * * : * . * . : * * . . . * * * . : : * * * :	
ScKOG1	LLLTGSSDGVIKIYRDYQDV-DTFKIVSAWRGLTDMLLTPRSTGLLTEWLQIRGSLLTG	1328
SpMip1	LLMTGSSDGTIKLYRDYEN--EKVELVTSWNSLSDLVFGDRNASLLMSWQQNCGHLLVAG	1108
mRAPTOR	LLLTATDDGAIRVWKNFADLEKNPEMVTAWQGLSDMLPTTRGAGMVVDWEQETGLLMSSG	1142
	** : * . : * * . : : : : : : : : : * . : : : * * * * : *	
ScKOG1	DVKVIRVWDAHTETVEVDIPAKTSSLITSLTADQLAGNIFVAGFADGSLRVYDRRLDPRD	1388
SpMip1	DVRVIRIWDASKEICYANLPVRSSNSITSLTSDLVGCNIIVAGFSDGVLRVYDKRLPARD	1168
mRAPTOR	DVRIVRIWDTDREMKVQDIPTGADSCVTSLSCDSHRS-LIVAGLDGGSIRVYDRRMALSE	1201
	** : : * * * * : * : : * . . . : * * * * : : * * * * * * : :	
ScKOG1	SMIRRWIRAGNDKQGVWINNVHLQRGYRELVS GATNGVVELWDIRSEDPVESFVDQNVTS	1448
SpMip1	SLTDVWKEHSS----EIVNVEMQSSGMRELI SASSDGEVKLWDIRMNHSLQTFSTDNSG-	1223
mRAPTOR	CRVMTYREHTA----WVVKASLQKRPDGHIVSVVNGDVRIFDPRMPESVNVLQIVKG--	1255
	. : : . : : * : : * : * * . : * * . : : : : :	
ScKOG1	QYGSQQKPTTMTCMQVHEHAPIIATG--TKQIKIWTTS GDLLNSFKNSHNNGTSTLAAT	1506
SpMip1	-----LTSLTVHSHAPVYATGSSNQSIKIWDTLGQNINTFREN-----	1261
mRAPTOR	-----LTALDIHPQADLIACGSVNQFTAIYNSSGELINNIKYYD-----	1294
	: * . : * * : * * . : * : : * : * . : :	
ScKOG1	GIPKLSYSSTSDAFLSSMAFHPRMMAIATNSHDSIVNIYKCEDERIDYF-----	1557
SpMip1	--PRFLNQPKPSS--LMCLKFHPHLL LACGDNTDSRVNLYSCTKNEIHTDSPNEF	1313
mRAPTOR	-----GFMGQRVGAISCLAFHPHPLAVG-SNDYYISVSVVEKRV-----	1335
	. : : * * * * : * . * : : * . . .	

Abbildung 8.3: Sequenzvergleich der TOR-Komplex-Mitglieder mRAPTOR aus Säugern und ScKOG1 aus *S. cerevisiae* und dem homologen Protein SpMip1 aus *S. pombe*. Die Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW2 durchgeführt. Dabei zeigt „ “ (ein Leerzeichen) keine Übereinstimmung, während „.“ bzw. „:“ die Übereinstimmung von zwei oder mehreren untersuchten Proteinen darstellt. Ist eine Aminosäure in allen Fällen identisch, so wird dieses mit einem „*“ angezeigt.

ScAVO3	ESDLKLLKANKVKLQQFKMEMLTRQLYDLSPSVVAVADQALYECIVAGNGSEELGTSFRMF	1024
SpSte20	N-----LNHWAIISLLIFQLYDPCLEVCKTAVKVLNEVCARNENLLAQVVLQPS	973
mRICTOR	E---RLVVESSTSSHMKIRSQSFNTDTTTSGISMSSSPSRETGVGDATMTDTCGSMST	1257
	: . : : : : : . * .	
ScAVO3	LNQMVFIIRSPILFELLSRPYGFQLLNEINFVKE-----ERDSWLSKKNIEYVHIVEEF	1077
SpSte20	LAHLGEIGSPLLLRFLATTVGFHYLSEINFIEH-----ELDNWYHHRNIDYVDLLEQN	1026
mRICTOR	VVSTKTIKTSHYLTQPNSHLSLSKSNVSLVPPGSSHTLPRRAQSLKAPSIIATIKSLADC	1317
	: * : . : : . : * : . : :	
ScAVO3	LKKNESIN--AKSLTFQQKSR----LPLHFYESLTKTEDGILLLSQTGDLVTFMN---VI	1128
SpSte20	FFLSFVSN--LKIIDKKNNEPDENILPLHFYEGELVKSPQGCEVLESSGHFESFMG---TL	1081
mRICTOR	NFSYTSRRDAFGYATLKRLLQQQRMHPSLSHSEALASPAKDVLFDTITMKANSFESRLTP	1377
	. : . . . * . * : .	
ScAVO3	KKYVNGNNMATVENAKEIIDLKA-ALWCVGFIFGTELIGLLDNYSLVEDIEEVAYNASV	1187
SpSte20	VEFYDKP-----LGNEAIRQLKS-ALWAINIGKTDQGITFLINHDTIPLIVKYAENSLI	1135
mRICTOR	SRFMKALSYASLDKEDLLSPINQNTLQRSSSVRSMVSSATYGGSDDYIGLALPVDINDIF	1437
	. : . . : : : * . : : : * .	
ScAVO3	TSVRFTAIFYVLGLISMTRREGCEILDEMG-----WNCCVSVQDEPIGIALPNR	1234
SpSte20	PTVRGTAYFVLGLISRTSKGVEILESLH-----WYSLMSLMGTSQGICIPRH	1182
mRICTOR	QVKDIPYFQTKNIPPHDDRARAFADAGGLPSGTGGLVKNSFHLLRQQMSLTEIMNSIH	1497
	. : . . : . . * . : : : : * . :	
ScAVO3	LDRFLSYNEHKWSAFGEYSDEMIVFNKSDGDLIEKCLPIEFDLKLLKEKDTAENPLNEK	1294
SpSte20	AGQVLS-----	1188
mRICTOR	SDASLFLESTEDTGLQEHTDDNCLYCVCIIEILGFQPSNQLSAICSHSDFQDIPYSWCEQ	1557
	. *	
ScAVO3	IITNKYDNDITSQTITVSGENSSLFANEGLSSPYVTQYRNDDDS-----IESKVL	1344
SpSte20	-----TPRRNVEFVNERVPTPEFSSLLSSLTN-----SEREVI	1221
mRICTOR	TIHNPLEVVPSKFSGISGSDGVSQEGSASSTKSTELLGVKTIIPDDTPMCRILLRKEVL	1617
	. . . : . . . : * :	
ScAVO3	HIVSQLGNHILSNHAVKEITEINNKYGPRLFENEKMFVKVFNMMSKYRFKPHVRKFLCGL	1404
SpSte20	RLVSNLSNHVLTNESARQLTKIRSKN-AKVFSSKRLVKACMTILGKFHYRVQIQQVFVFL	1280
mRICTOR	RLVINLSSSVSTKCHETGLLTIKEKY-PQTFDDICLYSEVSHLLSHCTFRLPCRRFIQEL	1676
	::* :*. . : : : : *..* . : *.. : : : : : : : * :	
ScAVO3	FINNRALENVIRHDNKRK-KRPFNFTR-----	1430
SpSte20	FPYSVLLSSSTSQDLNESPSRPNLSISA---	1309
mRICTOR	FQDVQFLQMHEEAVALATPPKQPIVDTSAES	1708
	* * . : :	

Abbildung 8.5: Sequenzvergleich der TOR-Komplex-Mitglieder mRICTOR aus Säugern und ScAVO3 aus *S. cerevisiae* und dem homologen Protein SpSte20 aus *S. pombe*. Die Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW2 durchgeführt. Dabei zeigt „ “ (ein Leerzeichen) keine Übereinstimmung, während „.“ bzw. „:“ die Übereinstimmung von zwei oder mehreren untersuchten Proteinen darstellt. Ist eine Aminosäure in allen Fällen identisch, so wird dieses mit einem „*“ angezeigt.

ScAVO1	MDTVTVLNLRAQFLRVCPEKDQMKRIKPYIPVDEFNTEQCLDSSIRELYMNSDGVSL	60
SpSin1	-----	
mSIN1	-----	
ScAVO1	PELESPPVSKDFMENYASLGKMRIMRENEGQKGANQNLI GAEKTERDEEETRNLQDKSA	120
SpSin1	-----	
mSIN1	-----	
ScAVO1	KNTLIVEENGLRYNPLNSSASNSLLNDDHTSGKHHKTSKEDSYLNSSMEMQKSSKR	180
SpSin1	-----MELTREKV	8
mSIN1	-----MAFLDNPT	8
	. *	

ScAV01	SSLPFVRIFKSRRDHSNTSGNKVMNTTNTRAKSSTLHPPGARHNKKGSKFDMNFDFDEN	240
SpSin1	LLLTFLRMQYS-----HILPDSIENRVISTEAPWELDKS	43
mSIN1	IILAHIRQSHVT-----SDDTGMCEMVLIDHDVD	37
	.. : *	
ScAV01	LEEDDDDDDDDEEGDDIHSQFFQLDDDFDAKSGGASPAHKGINGMSNNKNNTYTNNRNSI	300
SpSin1	LQD-----LLIHDYDYSKTSFSSSPPIVANDTVSNVRKPSDTKQVN--	84
mSIN1	LEK-----IHPPSMPGDSGSEIQ-----	55
	*.. * : * : *	
ScAV01	SILDDRESSNGNIGSASRLKSHFPTSQKGIKIFLTDNKNDGQKSDSLNANKGIHGDGSSAS	360
SpSin1	-----GAGGQVNHSRAEDSDYATS-----DLSESS	109
mSIN1	-----GSNGETQGYVYAQS-----VDITSSW	76
	..* : *	* : :
ScAV01	GNGSVSRDGLTETESNNISDMESYINEKDLDDLNFDTVTSNINKTVSDLGGHESTNDGTA	420
SpSin1	DVGDDDDNSCIFFSKVPMQKDVASIKEEERLDPKISTLNN--IDAIANLKLTMVLESSQA	167
mSIN1	DFGIRRRSNTAQRLERLRKERQNIKCKN-----IQWKERNKQSAQE	119
	. * * : : :	: : : ..
ScAV01	VMNRDSKDSRSNSNEFNAQNRDRITPGSSYGKSLGSEYSEERYSNNDSTMESGEMSLD	480
SpSin1	VNLTSSKQSSINQ-----QSSVSTDYDDLRSISEESFHLSQGEIPLT	209
mSIN1	LKSLFEKKS-----LKEKPPISGKQSILSVRLEQCPLQLN	154
	: . * . * : .. : *	
ScAV01	SDMQTNTIPSHSIPMSMQKYGIYHGDDSTLNNVFDKAVLTMNSSRHPKERRDTVISGKE	540
SpSin1	FPMNS-----SLTDTEADAVVAVD-----ALFPGKQ	235
mSIN1	NPFNEY-----SKFDGKG	167
	:: : : **	
ScAV01	PTSLTSSNRKFSVSSNLTSTRSPLLRGHGRTSSTASSEHMKAPKVSDSVLHRARKSTLTL	600
SpSin1	RGTHNTVVKARSVSN-----	250
mSIN1	HVGTTATKK-----	176
	. : : :	
ScAV01	KQDHSQPSVPSSVHKSSKEGNILIEKTTDYLVSKPKASQLSNMFMNKKKRTNTNSVDVLE	660
SpSin1	-----AKAPTSALRALLEHKENSQNG--PLAE	276
mSIN1	-----	
ScAV01	YFSFVCGDKVPNYESMGLEIYIQASKK-YKRNSFTTKVRKSSTIFEVIGFALFLYSTEKK	719
SpSin1	NFATFSGHAESN--ALRLNIYFPSSS-PSK-PLFVELRKNVLVSEAIGYILLQYVNOQL	332
mSIN1	-----IDVYLPLHSSQDRLLPMTVVTMASARVQDLIGLICWQYTSEGR	219
	::* : . . . : : ** * : :	
ScAV01	PDNFEEGLTVEDISNPNFSLKIVDEDEGEFFEDNFGKLDKSTIQSISDSEVVLCVKVD	779
SpSin1	VPPIEDEAQ-----NPNYWNLRIVEDDGE-LDEDFPALDRVGPLSKFGFADFALVKATP	385
mSIN1	EPKLNNDVNS-----AYCLHIAEDDGE-VDTDFPPLDSNEPIHKFGFSTLALVEKYS	269
	::: : * : * : * : * : * : * : *	
ScAV01	AEKSQNEIETPLPFETGGGLMDASTLDANSSHDTTDGTINQLSFYKPIIGNEDDIDKTNG	839
SpSin1	AQIKENQAAYPFKSKHPTSIPEANNKTHIRHTSSTSSQSQKQ-----AQDVKDTLNT	437
mSIN1	SPGLTSKESLFVRINAAGHGFSLIQVDNTKVTMKEILLKAVKR-----RKGSQKVSG	320
	: . : . : . : . : . : . : .	
ScAV01	SKIIDVTVYLYPNVNPKNFYTTISVLVTSHINDILVKYCKMKNMDPNEYALKVLGKNYIL	899
SpSin1	SHVVQVRLPPYG---DNARFCNIEISKTRLAMVLNQVCWMKQLERFKYTLRVAGSDTVL	494
mSIN1	P-----QYRLEKQSEPNVAVDLDSTLESQSAWEFCLVRENSRAD	360
	. : . : . : . : . : *	..
ScAV01	DLNDTVLRLDGINKVELISKKDARELHLEKMKPDLKPKVLPPTIQSNDLTPLTLEPLNSYL	959
SpSin1	PLDKTFSSLDGNPTLELVKKKVR-----	517
mSIN1	GVFEEDSQIDIATVQDMLSSHYY-----	383
	: . : * : : : :	
ScAV01	KADAGGAVAAIPENTKVTSKAKKISTKYKLGAKQHSSSSVASGSVSTAGGLANGNGFFK	1019
SpSin1	--DKKGSTQQLPT-----	528
mSIN1	-----	

```

ScAVO1      NKNSSKSSLHGTLQFHNINRSQSTMEHTPDTPNGVGDNFQDLFTGAYHKYKVVRRQQMSF 1079
SpSin1     --SSPQNSVYGSIKKDAQSSTYNATDIMSSN-----TYQEFVLVWKRQPVSF 572
mSIN1      --KSFKVSMIHRLRFTTQVQLGISGDKVEIDP-----VTNQKASTKFKWIKQKP-- 429
           . * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
           . * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

ScAVO1      INKHERTLAIDGDYIYIVPPEGRIHWHHDNVKTKSLHISQVVLVKKSKRVPEHFKIFVRR 1139
SpSin1     MGRHERLLAIDGEYVHIMPSES-KNIFETPKTSSIHAGSII LCKQSKKSPCNFKMIVSKN 631
mSIN1      ISIDSLLCACDLAEEKSPSHAI FKLTYLSNHDKHLYFESDAATVNEI VLKVNYILES R 489
           : . . . * . . * . . : : : . * . . . : . : : : : .

ScAVO1      GQDDIKRYFFEAVSGQECTEIVTRLQNL LLSAYRMNHK 1176
SpSin1     --RETKRYDFEVL SALEAAIIVSRIRALMNTVKKIN- 665
mSIN1      ASTARADYFAQKQRKLNRRRTSFSFQKEKKSQQ---- 522
           * : : : : : : : : : : : : : : :

```

Abbildung 8.6: Sequenzvergleich der TOR-Komplex-Mitglieder mSIN1 aus Säugern und ScAVO1 aus *S. cerevisiae* und dem homologen Protein SpSin1 aus *S. pombe*. Die Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW2 durchgeführt. Dabei zeigt „ “ (ein Leerzeichen) keine Übereinstimmung, während „.“ bzw. „:“ die Übereinstimmung von zweien oder mehreren untersuchten Proteinen darstellt. Ist eine Aminosäure in allen Fällen identisch, so wird dieses mit einem „*“ angezeigt.

8.3 Sequenzvergleiche der SpClc1, ScCLC1 und mCLC1

Aminosäuresequenzvergleiche zwischen den Proteinen mCLC1A/mCLC1B und ScCLC1 zeigten eine Identität von 13% / 14%, während ein Vergleich von mCLC1A / mCLC1B und SpClc1 eine 19% / 19%ige Identität der Aminosäuresequenz ergab (Abbildung 8.7).

```

mCLC1A      -MAELDPFGAPAGAPGGPALGNVAGAGEEDPAAAF LAQQ-----ESEIAGIENDE 50
mCLC1B      ---MADDFGFFSSSE-----SGAPEAAEEDPAAAF LAQQ-----ESEIAGIENDE 42
SpClc1      -MSQFPALED FDDGLVTAPVDDSKNNTDFLEREKLALGED-----AGQFETPEDKD 50
ScCLC1      MSEKFPPLDQNI DFTPN--DKKDDDTDFLKREAEILGDEFKTEQDDIILETEASPAKDDD 58
           : . . . : . * . : : : : : : : : :

mCLC1A      AFAILDGGAPGPQPHGEPPG-GPDAVDGVMNGEYYQESNGPTDSYAAISQVDRLQSE--P 107
mCLC1B      GFGAPAGSHAAPAQPGPTSGAGSEDMGTTVNGDVFQEANGPADGYAAIAQADRLTQE--P 100
SpClc1      ALLNFENDSEAEQTRFEQNFPPI DAEMQASG--TFSAPKAPYMGQAEVHPPEDESGD--P 106
ScCLC1      EIRDFEEQFPDINSANGAVSSDQNGSATVSSGNDNGEADDDFSTFEKANQSTESVKEDRS 118
           : . . . : . . . . . : : .

mCLC1A      ESIRKWREEQMERLEALDANSRKQEA EWKEKAIKELEEWYARQDEQLQKTKANNRVADEA 167
mCLC1B      ESIRKWREEQRKRLQELDAASKVTEQEWREKAKKDL EEWNRQSEQVEKNKINNRIADKA 160
SpClc1      EPVRKWKEDQMKRIQERDESSKLR ESNIEKARKAIDDFYENFNDKRDKVI AKSRKEQEK 166
ScCLC1      EVVDQWKQRRAVEIHEKDLKDEELKKE LQDEAIKHIDDFYDSYNKKKEQQL EDAAKEAEA 178
           * : : * : : : . . . * . . . . : * * : : : . . : : .

mCLC1A      FYKQPFADVIGYVTNINHPCYSLEQA AEEAFVNDIDESSPGTEWERVERL CDFNPKSSKQ 227
mCLC1B      FYQQPDADIIGYV-----ASEEAFVKESKEETPGTEWEKVAQLCDFNPKSSKQ 208
SpClc1      LLEE-----NESKSTGTTSWERILK LIDLSDKPEAH 197
ScCLC1      FLKK-----RDEFFGQDNTTWDRALQLINQDDADIIG 210
           : : : : : : : : : : * * : : : * : .

mCLC1A      AKDVSRRMSVLISLKQAPLVH----- 248
mCLC1B      CKDVSRLRSVLM SLKQTPLSR----- 229
SpClc1      GRSTERFRELLISLAKDSNAPGAAGTTVSSSS 229
ScCLC1      GRDRSKFKEILLRLKGNAPGA----- 233
           : . . : : : : * * .

```

Abbildung 8.7: Sequenzvergleich von mCLC1A bzw. mCLC1B aus Säugern, ScCLC1 aus *S. cerevisiae* und SpClc1 aus *S. pombe*. Die Sequenzvergleiche wurden mit ClustalW2 durchgeführt. Dabei zeigt „ “ (ein Leerzeichen) keine Übereinstimmung, während „.“ bzw. „:“ die Übereinstimmung von zweien oder mehreren untersuchten Proteinen darstellt. Ist eine Aminosäure in allen Fällen identisch, so wird dieses mit einem „*“ angezeigt.

9 Literaturverzeichnis

- Adami A., B. Garcia-Alvarez, E. Arias-Palomo, D. Barford and O. Llorca** (2007). Structure of TOR and its complex with KOG1. *Mol. Cell.* 27, 509–516.
- Alarcon C. M., M. E. Cardenas and J Heitman** (1996). Mammalian RAFT1 kinase domain provides rapamycin-sensitive TOR function in yeast. *Genes Dev* 10:279–288.
- Alarcón C. M. and J Heitman** (1997). FKBP12 physically and functionally interacts with aspartokinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 17(10):5968-75.
- Alessi D. R., M. Andjelkovic and B. Caudwell** (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541-6551.
- Alessi D. R., S. R. James and C. P Downes** (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol.* 7:261-269.
- Alvarez B. and S. Moreno** (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J. Cell Sci.* 119, 4475–4485.
- Araki T., Y. Uesono, T. Oguchi and E. A. Toh** (2005). LAS24/KOG1, a component of the TOR complex 1 (TORC1), is needed for resistance to local anesthetic tetracaine and normal distribution of actin cytoskeleton in yeast. *Genes Genet. Syst* 80, 325–343.
- Aronova S., K. Wedaman, S. Anderson, J. Yates and T. Powers** (2007). Probing the membrane environment of the TOR kinases reveals functional interactions between TORC1, actin, and membrane trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 18, 2779–2794.
- 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* 6:1692–5.
- Audhya A., R. Loewith, A. B. Parsons, L. Gao, M. Tabuchi, H. Zhou, C. Boone, M. N. Hall and S. D. Emr** (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI_{4,5}P₂ effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 23, 3747–3757.
- Avila-Flores A., T. Santos, E. Rincon and I. Merida** (2005). Modulation of the mammalian target of rapamycin pathway by diacylglycerol kinase-produced phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.* 280, 10091–10099.
- Bae G. U., D. W. Seo, H. K. Kwon, H. Y. Lee, S. Hong, Z. W. Lee, K. S. Ha, H. W. Lee and J. W. Han** (1999). Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. *J Biol Chem.* 12;274(46):32596-602.
- 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* 14:943–51.

- Banuett F.** (1998). Signaling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:249–274.
- 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.
- Barbet N. C., U. Schneider, S. B. Helliwell, I. Stansfield, M. F. Tuite and M. N. Hall** (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 7:25–42.
- Bateman J. M and H. McNeill** (2004). Temporal control of differentiation by the insulin receptor/tor pathway in *Drosophila*. *Cell* 1;119(1):87-96.
- Beck T. and M. N. Hall.** (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402:689–692.
- Beck T., A. Schmidt and M. N. Hall.** (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* 146:1227–1238.
- Beeler T., D. Bacikova, K. Gable, L. Hopkins, C. Johnson, H. Slife and T. Dunn** (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca²⁺-sensitive *Δcsg2* mutant. *J. Biol. Chem.* 273, 30688–30694
- Beeler T, K. Gable, C. Zhao and T. Dunn** (1994). A novel protein, CSG2p, is required for Ca²⁺ regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 11;269(10):7279-84.
- Berchtold D. and T. C. Walther** (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol Biol Cell.* 20(5):1565-75.
- Beretta L., A. C. Gingras, Y. V. Svitkin, M. N. Hall and N. Sonenberg** (1996). Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits capdependent initiation of translation. *EMBO J.* 15:658–664.
- Beugnet A., X. Wang and C. G. Proud** (2003). Target of rapamycin (TOR)- signaling and RAIP motifs play distinct roles in the mammalian. TOR dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J. Biol. Chem.* 278:40717–40722.
- Bickle M, P. A. Delley, A. Schmidt and M. N. Hall** (1998). Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J* 17:2235–2245.
- Bimbo A., Y. Jia, S. L. Poh, R. K. Karuturi, N. den Elzen, N., 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, 799–813.
- Biondi R. M.** (2004) Phosphoinositide-dependent protein kinase 1, a sensor of protein conformation. *Trends Biochem. Sci.* 29, 136–142.
- Biondi R. M. and A. R. Nebreda** (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.* 372, 1–13.

- Blank G. S. and F. M. Brodsky** (1987). Clathrin assembly involves a light chain-binding region. *J Cell Biol.* 105(5):2011-9.
- Bosotti R, A. Isacchi and E. L. Sonnhammer** (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci* 25:225–227.
- Bram R.J., D.T. Hung, P. K. Martin, S. L. Schreiber and G. R. Crabtree** (1993). Identification of the immunophilins capable of mediating inhibition of signal transduction by cyclosporin A and FK506: roles of calcineurin binding and cellular location. *Mol Cell Biol.* (8):4760-9.
- Bresch C., G. Muller and R. Egel** (1968). Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast. *Mol. Gen. Genet.* 102:301–306.
- Brillantes A. B., K. Ondrias, A. Scott, E. Kobrinsky, E. Ondriasová, M. C. Moschella, T. Jayaraman, M. Landers, B. E. Ehrlich and A. R. Marks** (1994). Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 77(4):513-23.
- Brodsky F. M., B. L. Hill, S. L. Acton, I. Näthke, D. H. Wong, S. Ponnambalam and P. Parham** (1991). Clathrin light chains: arrays of protein motifs that regulate coated-vesicle dynamics. *Trends Biochem Sci.* 16(6):208-13.
- Brown E. J., P. A. Beal, C. T. Keith, J. Chen, T. B. Shin and S. L. Schreiber** (1995). Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP *in vivo*. *Nature* 377:441–446.
- Brugarolas J., K. Lei, R. L. Hurley, B. D. Manning and J. H. Reiling** (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18:2893–2904.
- Brunn G. J., C. C. Hudson, A. Sekulic, J. M. Williams, H. Hosoi, P. J. Houghton, J. C. Lawrence Jr. and R. T. Abraham.** 1997. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* 277:99–101.
- Brunn G. J., J. Williams, C. Sabers, G. Wiederrecht, J. C. Lawrence Jr and R. T. Abraham** (1996). Direct inhibition of the signaling functions of the mammalian target of rapamycin by the phosphoinositide 3-kinase inhibitors, wortmannin and LY294002. *EMBO J.* 15(19):5256-67.
- Buerger C., B. DeVries und V. Stambolic** (2006). Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. *Biochem Biophys Res Commun.* 344(3):869-80.
- Burnette W.N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112(2):195-203.
- Burnett P. E., R. K. Barrow, N. A. Cohen, S. H. Synder and D. M. Sabatini** (1998). RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1432–1437.

- Cafferkey R., P.R. Young, M. M. McLaughlin, D. J. Bergsma, Y. Koltin, G. M. Sathe, L. Faucette, W. K. Eng, R. K. Johnson and G. P. Livi GP** (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol Cell Biol* 13:6012–6023.
- Calvo V., C. M. Crews, T. A. Vik and B. E. Bierer** (1992). Interleukin 2 stimulation of p70 S6 kinase activity is inhibited by the immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(16):7571-5.
- Cantley LC** (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657.
- Cardenas M. E., N. S. Cutler, M. C. Lorenz, C. J. Di Como and J. Heitman** (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13:3271–3279.
- Cardenas M. E. and J. Heitman** (1995). FKBP12-rapamycin target TOR2 is a vacuolar protein with an associated phosphatidylinositol-4 kinase activity. *EMBO J.* 14, 5892–5907.
- Carrière A., M. Cargnello, L. A. Julien, H. Gao, E. Bonneil, P. Thibault and P. P. Roux** (2008). Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol.* 18(17):1269-77.
- 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.
- Chen M. Y., Y. Long and P. N. Devreotes** (1997). A novel cytosolic regulator, pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in *Dictyostelium*. *Genes Dev.* 11, 3218–3231.
- Chen J., X. F. Zheng, E. J. Brown and S. L. Schreiber** (1995). Identification of an 11-kDa FKBP12-rapamycin-binding domain within the 289-kDa FKBP12-rapamycin-associated protein and characterization of a critical serine residue. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4947–4951.
- Chen E. J. and C. A. Kaiser** (2003). LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *J. Cell Biol.* 161, 333–347.
- 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.
- Chiang G.G. and R. T. Abraham** (2005). Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem.* 280(27):25485-90.
- Choi J., J. Chen, S. L. Schreiber and J. Clardy** (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* 273:239–242.

- Choi K. M., L. P. McMahon and J. C. Lawrence Jr.** (2003). Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor. *J. Biol. Chem.* 278:19667–19673.
- Choo A. Y., S. O. Yoon, S. G. Kim, P. P. Roux and J. Blenis** (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA* 105(45):17414-9.
- Chu I., J. Sun, A. Arnaout, H. Kahn, W. Hanna, S. Narod, P. Sun, C. K. Tan, L. Hengst and J. Slingerland** (2007). p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell* 128(2):281-94.
- Chung J., C. J. Kuo, G. R. Crabtree and J. Blenis** (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69, 1227–1236.
- Cosentino G. P., T. Schmelzle, A. Haghghat, S. B. Helliwell, M. N. Hall and N. Sonenberg** (2000). Eaplp, a novel eukaryotic translation initiation factor 4E-associated protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20:4604–4613.
- Cox K. H., A. Kulkarni , J. J. Tate and T. G. Cooper** (2004). Gln3 phosphorylation and intracellular localization in nutrient limitation and starvation differ from those generated by rapamycin inhibition of Tor1/2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279(11):10270-8.
- Crespo J.L., K. Daicho, T. Ushimaru and M. N. Hall** (2001). The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 276(37):34441-4.
- Crespo J. L. and M. N. Hall** (2002). Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:579–591.
- Cross D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings** (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–789.
- Cutler N. S., J. Heitman and M. E. Cardenas** (1999).TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Endocrinol.* 155(1-2):135-42.
- Cutler N. S., X. Pan, J. Heitman and M. E. Cardenas** (2001). The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol. Biol. Cell* 12:4103–4113.
- Dames S. A., J. M. Mulet, K. Rathgeb-Szabo, M. N. Hall and S. Grzesiek** (2005) The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *J. Biol. Chem.* 280, 20558–20564.

- Dan H. C., M. Sun, L. Yang, R. I. Feldman, 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 tuberlin. *J. Biol. Chem.* 277:35364–35370.
- Davies S. P., N. R. Helps, P. T. W. 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 and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett.* 377, 421-425.
- Decker T., S. Hipp, I. Ringshausen, C. Bogner, M. Oelsner, F. Schnell and C. Peschel** (2003). Rapamycin-induced G1 arrest in cycling B-CLL cells is associated with reduced expression of cyclin D3, cyclin E, cyclin A, and survivin. *Blood* 101(1):278-85.
- Degols G., K. Shiozaki and P. Russel** (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2870-2877.
- deHart A. K., J. D. Schnell, D. A. Allen, J. Y. Tsai and L. Hicke** (2003). Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Mol. Biol. Cell* 14, 4676–4684.
- Degols G. and P. Russel** (1997). Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV-response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3356-3363.
- de Groot R. P., L. M. Ballou and P. Sassone-Corsi** (1994). Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell* 79(1):81-91.
- Dennis P. B., S. Fumagalli and G. Thomas** (1999). Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9(1):49-54.
- Dennis P. B., N. Pullen, R. B. Pearson, S. C. Kozma and G. Thomas** (1998). Phosphorylation sites in the autoinhibitory domain participate in p70(s6k) activation loop phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 273, 14845–14852.
- 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.
- Deprost D., H. N. Truong, C. Robaglia and C. Meyer** (2005). An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* 326: 844–850.
- Deprost D., L. Yao, R. Sormani, M. Moreau, G. Leterreux, M. Nicolai, M. Bedu, C. Robaglia and C. Meyer** (2007). The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8(9):864-70.
- Desai B. N., B. R. Myers and S. L. Schreiber** (2002). FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(7):4319-24.

- De Virgilio C. and R. Loewith** (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25(48):6392-415.
- Diaz-Troya S., F. J. Florencio and J. L. Crespo** (2008). Target of Rapamycin and LST8 Proteins Associate with Membranes from the Endoplasmic Reticulum in the unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 7: 212-222.
- Di Como C. J. and K. T. Arndt** (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* 10:1904–1916.
- 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 L. Q. and F. Liu** (2005). PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289(2):E187-96.
- Drenan R. M., X. Liu, P. G. Bertram and X. F. S. Zheng** (2004). FKBP12-rapamycin-associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 279, 772–778.
- Dunlop E. A, K. M. Dodd, L. A. Seymour and A. R. Tee** (2009). Mammalian target of rapamycin complex 1-mediated phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 requires multiple protein-protein interactions for substrate recognition. *Cell Signal.* 21(7):1073-84.
- Edinger A. L., C. M. Linardic, G. G. Chiang, C. B. Thompson and R. T. Abraham** (2003). Differential effects of rapamycin on mammalian target of rapamycin signaling functions in mammalian cells. *Cancer Res.* 63:8451-8460.
- 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.
- Etienne-Manneville S. and A. Hall** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420(6916):629-35.
- Fadri M., A. Daquinag, S. Wang, T. Xue and J. Kunz** (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol. Biol. Cell* 16, 1883–1900.
- Fang Y., M. Vilella-Bach, R. Bachmann, A. Flanigan and J. Chen** (2001). Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 294, 1942–1945.
- Fantes P. and P. Nurse** (1977) Control of cell size at division in fission yeast by growth-modulated size control over nuclear division. *Exp. Cell Res.* 107, 377–386.
- Feldman M.E., B. Apsel, A. Uotila, R. Loewith, Z. A. Knight, D. Ruggero and K. M. Shokat** (2009). Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* 7(2):e38.

- Feng Z., H. Zhang, A. J. Levine and S. Jin** (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102(23):8204-9.
- Ferrari S., R. B. Pearson, M. Siegmann, S. C. Kozma and G. Thomas** (1993). The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of p70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites. *Biol Chem.* 268(22):16091-4.
- Fields S. and O. Song** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.
- Fingar D. C. and J. Blenis** (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 23:3151-3171.
- Fingar D. C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow and J. Blenis** (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* 16:1472-1487.
- Flynn P., H. Mellor, R. Palmer, G. Panayotou and P. J. Parker** (1998). Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the Hr1 repeat motif. *J Biol Chem.* 273(5):2698-705.
- Fonseca B. D., E. Q. Smith, V. 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, 24514-24524.
- Foster D. A.** (2007) Regulation of mTOR by phosphatidic acid? *Cancer Res.* 67, 1-4.
- 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.
- Fumarola C., S. La Monica, R. R. Alfieri, E. Borra and G. G. Guidotti** (2005). Cell size reduction induced by inhibition of the mTOR/S6K-signaling pathway protects Jurkat cells from apoptosis. *Cell Death Differ.* 12(10):1344-57.
- Gaits F. and P. Russell** (1999). Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/StyI in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 10(5):1395-407.
- Gangloff Y. G., M. Mueller and S. G. Dann** (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol. Cell. Biol.* 24:9508-9516.
- Gao X., Y. Zhang and P. Arrazola** (2002). Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat. Cell. Biol.* 4:699-704.
- Garami, A., F. J. Zwartkuis, 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-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol. Cell* 11:1457-1466.

- Garcia-Martinez J. M. and D. R. Alessi** (2008). mTOR complex-2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum and glucocorticoid induced protein kinase-1 (SGK1). *Biochem. J.* 416: 375–385.
- Ghibelli L., C. Nosseri, S. Coppola, V. Maresca and L. Dini** (1995). The increase in H₂O₂-induced apoptosis by ADP-ribosylation inhibitors is related to cell blebbing. *Exp Cell Res.* 221(2):470-7.
- 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: 527-34.
- Giniger E., S. M. Varnum and M. Ptashne** (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40(4):767-74.
- Giot L., J. S. Bader, C. Brouwer, A. Chaudhuri, B. Kuang, Y. Li, Y. L. Hao, C. E. Ooi, B. Godwin, E. Vitols, G. Vijayadamodar, P. Pochart, H. Machineni, M. Welsh, Y. Kong, B. Zerhusen, R. Malcolm, Z. Varrone, A. Collis, M. Minto, S. Burgess, L. McDaniel L, E. Stimpson, F. Spriggs, J. Williams, K. Neurath, N. Ioime, M. Agee, E. Voss, K. Furtak, R. Renzulli, N. Aanensen, S. Carrolla, E. Bickelhaupt, Y. Lazovatsky, A. DaSilva, J. Zhong, C. A. Stanyon, R. L. Finley Jr, K. P. White, M. Braverman, T. Jarvie, S. Gold, M. Leach, J. Knight, R. A. Shimkets, M. P. McKenna, J. Chant and J. M. Rothberg** (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302(5651):1727-36.
- Gold, M. G., D. Barford and D. Komander** (2006) Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16, 693–701.
- Görner W., E. Durchschlag, M. T. Martinez-Pastor, F. Estruch, G. Ammerer, B. Hamilton, H. Ruis and C. Schüller** (1998). Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 12(4):586-97.
- Greenlund L. J., T. L. Deckwerth and E. M. Johnson Jr.**(1995). Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death. *Neuron* 14(2):303-15.
- Grenson M., M. Crabeel, J. M. Wiame and J. Bechet** (1968). Inhibition of protein synthesis and simulation of permease turnover in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 30, 414-419.
- Guertin D. A., D. M. Stevens and C. C. Thoreen** (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKC α , but not S6K1. *Dev. Cell* 11:859-871.
- Gupta S., D. Campbell, B. Derijard and R. J. Davies** (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267, 389–393.
- Gustin M. C., J. Albertyn, M. Alexander and K. Davenport** (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62, 1264-1300.

- 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):214-26.
- Hagan I. M.** (2008). The spindle pole body plays a key role in controlling mitotic commitment in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Soc Trans*. 36(5):1097-101.
- 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).
- Hanks S. K. and T. Hunter** (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. 9(8):576-96.
- 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.
- Hardie D. G.** (2004). The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream. *J Cell Sci*. 117(Pt 23):5479-87.
- Hardie D. G.** (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8(10), 774-785.
- Hardwick J. S., F. G. Kuruvilla, J. K. Tong, A. F. Shamji and S. L. Schreiber** (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14866-14870.
- Harrington L. S., G. M. Findlay and A. Gray** (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell. Biol.* 166:213-223.
- 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(Pt 11):1737-46.
- 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):1357-70.
- Heitman J., N. R. Movva and M. N. Hall** (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905-909.
- Helliwell S. B., P. Wagner, J. Kunz, M. Deuter-Reinhard, R. Henriquez and M. N. Hall** (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5:105-118.
- Helliwell S. B., A. Schmidt, Y. Ohya and M. N. Hall** (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* 8:1211-1214.

- Hilti N., D. Baumann, A. M. Schweingruber, P. Bigler and M. E. Schweingruber** (1999). Gene *ste20* controls amiloride sensitivity and fertility in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 35: 585-592.
- Hleb M., S. Murphy, E. F. Wagner, N. N. Hanna, N. Sharma, J. Park, X. C. Li, T. B. Strom, J. F. Padbury, Y. T. Tseng and S. Sharma** (2004). Evidence for cyclin D3 as a novel target of rapamycin in human T lymphocytes. *J Biol Chem.* 23;279(30):31948-55.
- Ho H. L., H. Y. Lee, H. C. Liao and M. Y. Chen** (2008). Involvement of *Saccharomyces cerevisiae* Avo3p/Tsc11p in maintaining TOR complex 2 integrity and coupling to downstream signaling. *Eukaryot Cell.* 7(8):1328-43.
- Ho H. L., Y. S. Shiau and M. Y. Chen** (2005). *Saccharomyces cerevisiae* TSC11/AVO3 participates in regulating cell integrity and functionally interacts with components of the Tor2 complex. *Curr Genet.* 47(5):273-88.
- Hockenbery D. M., Z. N. Oltvai, X. M. Yin, C. L. Millman and S. J. Korsmeyer** (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75(2):241-51.
- Holz M. K. and J. Blenis** (2005). Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J. Biol. Chem.* 280:26089-26093.
- Hong F., M. D. Larrea, C. Doughty, D. J. Kwiatkowski, R. Squillace and J. M. Slingerland** (2008). mTOR-raptor binds and activates SGK1 to regulate p27 phosphorylation. *Mol. Cell* 30(6):701-11.
- Huang K. M., L. Gullberg, K. K. Nelson, C. J. Stefan, K. Blumer and S. K. Lemmon** (1997). Novel functions of clathrin light chains: clathrin heavy chain trimerization is defective in light chain-deficient yeast. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 7):899-910.
- Huang C., J. Li, Q. Ke, S. S. Leonard, B. H. Jiang, X. S. Zhong, M. Costa, V. Castranova and X. Shi** (2002). Ultraviolet-induced phosphorylation of p70(S6K) at Thr(389) and Thr(421)/Ser(424) involves hydrogen peroxide and mammalian target of rapamycin but not Akt and atypical protein kinase C. *Cancer Res.* 62(20):5689-97.
- Huh W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman and E. K. O'Shea** (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425:686-691.
- 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):358-64.
- 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.
- Inoki K., Y. Li, T. Xu and K. L. 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 and K. L. Guan (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115:577–590.

Isotani S., K. Hara, C. Tokunaga, H. Inoue, J. Avruch and K. Yonezawa (1999). Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 274:34493–34498.

Jacinto E., V. Facchinetti and D. Liu (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127:125-137.

Jacinto E., B. Guo, K. T. Arndt, T. Schmelzle and M. N. Hall (2001). TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol. Cell* 8:1017–1026.

Jacinto E., R. Loewith and A. Schmidt (2004). Mammalian TOR-complex 2 controls the actin cytoskeleton and is Rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6:1122-1128.

Jacinto E. and A. Lorberg (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem. J.* 410, 19-37.

James P., J. Halladay and E. A. Craig (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425–1436.

Jefferies H. B., S. Fumagalli, P. B. Dennis, C. Reinhard, R. B. Pearson and G. Thomas (1997). Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 16(12):3693-704.

Johannessen C. M., E. E. Reczek, M. F. James H. Brems E. Legius and K. Cichowski (2005). The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *PNAS* 102 (24): 8573-8578.

Joung J. K., E. I. Ramm and C. O. Pabo (2000). A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(13):7382-7.

Kamada Y., Y. Fujioka, N. N. Suzuki, F. Inagaki, S. Wullschleger, R. Loewith, M. N. Hall and Y. Ohsumi (2005) Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7239–7248.

Kane D. J., T. A. Sarafian, R. Anton, H. Hahn, E. B. Gralla, J. S. Valentine, T. Ord and D. E. Bredesen (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262(5137):1274-7.

Kannan N., N. Haste, S. S. Taylor and A. F. Neuwald (2007). The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a *cis*-acting regulatory module. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1272–127.

Kanoh J. and M. Yanagida (2007). Tel2: a common partner of PIK-related kinases and a link between DNA checkpoint and nutritional response? *Genes Cells* 12(12):1301-4.

- Karagiannis J., R. Saleki and P. G. Young** (1999). The *pub1* E3 ubiquitin ligase negatively regulates leucine uptake in response to NH_4^+ in fission yeast. *Curr. Genet.* 35, 593-601.
- Kato T., K. Okazaki, H. Murakami, S. Stettler, P. Fantes and H. Okayama** (1996). Stress signal, mediated by a HOG-like MAP-kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett.* 378: 297-212.
- Katso R., K. Okkenhaug, K. Ahmadi, S. White, J. Timms and M. D. Waterfield** (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:615-75.
- Kawai M., A. Nakashima, M. Ueno, T. Ushimaru and K. Aiba** (2001). Fission yeast *tor1* functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Curr. Genet.* 39: 166–174.
- Keen J. H., M. C. Willingham and I. H. Pastan** (1979). Clathrin-coated vesicles: isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell* 16(2):303-12.
- Keith C. T and S. L. Schreiber** (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270:50–51.
- Kemp J. T., M. K. Balasubramanian and K. L. Gould** (1997). A *wat1* mutant of fission yeast is defective in cell morphology. *Mol. Gen. Genet.* 254: 127-138.
- Keranen L. M., E. M. Dutil and A. C. Newton** (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* 5(12):1394-1403.
- Kim J. E. and J. Chen** (2000). Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:14340-14345.
- Kim D. H., D. D. Sarbassov and S. M. Ali** (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110:163-175.
- Kim D. H., D. Sarbassov dos, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini** (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11:895–904.
- 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) signaling pathway. *Genes Cells* 8, 65-79.
- Kinnon C. and M. J. Owen** (1983). Clathrin-coated vesicles purified from a human B lymphocyte cell line contain newly synthesized glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 1983 258(13):8470-6.
- Kinoshita E., E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama and T. Koike** (2006). Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteomics* 5(4):749-57.

- Kirchhausen T and S. C. Harrison** (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 23(3):755-61.
- 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.
- Koltin Y., L. Faucette, D: J. Bergsma, M. A. Levy, R. Cafferkey, P. L. Koser, R. K. Johnson and G. P. Livi** (1991). Rapamycin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase related to human FK506-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 11(3):1718-23.
- Komeili A., K. P. Wedaman, E. K. O'Shea and T. Powers** (2000). Mechanism of metabolic control. Target of rapamycin signaling links nitrogen quality to the activity of the Rtg1 and Rtg3 transcription factors. *J. Cell Biol.* 151:863–878.
- 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* 73:585–596.
- Kunz J., U. Schneider, I. Howald, A. Schmidt and M. N. Hall** (2000). HEAT repeats mediate plasma membrane localization of TOR2 in yeast. *J. Biol. Chem.* 275(47):37011-20.
- Kuo C.J., J. Chung, D. E. Fiorentino, W. M. Flanagan, J. Blenis and G. R. Crabtree** (1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 358(6381):70-3.
- Laemmli U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lallet S., H. Garreau, C. Poisier, E. Boy-Marcotte and M. Jacquet** (2004). Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus. *Mol. Genet. Genomics* 272(3):353-62.
- Lane . P. and L. V. Crawford** (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature (London)* 278, 261-263.
- Lane D. P., X. Lu, T. Hupp and P. A. Hall** (1994). The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 345(1313):277-80.
- Lee G and J. Chung** (2007). Discrete functions of rictor and raptor in cell growth regulation in *Drosophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357(4):1154-9.
- Lee S., F. I. Comer, A. Sasaki, I. X. McLeod, Y. Duong, K. Okumura, J. R. Yates, C: A. Parent and R. A. Firtel** (2005). TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell.* 16:4572–83.
- Lee S., C. A. Parent, R. Insall and R. A. Firtel** (1999). A novel Ras-interacting protein required for chemotaxis and cyclic adenosine monophosphate signal relay in *Dictyostelium*. *Mol. Biol. Cell.* 10(9):2829-45.

- Lehnart S. E., F. Huang, S. O. Marx and A. R. Marks** (2003). Immunophilins and coupled gating of ryanodine receptors. *Curr. Top. Med. Chem.* 3(12):1383-91.
- Lemansky P., A. Hasilik, K. von Figura, S. Helmy, J. Fishman, R. E. Fine, N. L. Kedersha and L. H. Rome** (1987). Lysosomal enzyme precursors in coated vesicles derived from the exocytic and endocytic pathways. *J. Cell. Biol.* 104(6):1743-8.
- Lemmon S. K. and E. W. Jones** (1987). Clathrin requirement for normal growth of yeast. *Science* 238(4826):504-9.
- Leung-Pineda V., Y. Pan, H. Chen and M. S. Kilberg** (2004). Induction of p21 and p27 expression by amino acid deprivation of HepG2 human hepatoma cells involves mRNA stabilization. *Biochem. J.* 379(Pt 1):79-88.
- Leupold U.** (1970). *Methods Cell. Physiol.* 4, 169-177.
- Li Y., M. N. Corradetti, K. Inoki and K. L. Guan** (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci* 29:32–38.
- Li H., C. K. Tsang, M. Watkins, P. G. Bertram and X. F. Zheng** (2006). Nutrient regulates Tor1 nuclear localization and association with rDNA promoter. *Nature* 442:1058-1061.
- Liang J., J. Zubovitz, T. Petrocelli, R. Kotchetkov, M. K. Connor, K. Han, J. H. Lee, S. Ciarallo, C. Catzavelos and R. Beniston** (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat. Med.* 8, 1153–1160.
- Lin T. A., X. Kong, T. A. Haystead, A. Pause, G. Belsham, N. Sonenberg and J. C. Lawrence Jr.** (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* Vol 266, Issue 5185, 653-656.
- Lin T. A., X. Kong, A. R. Saltiel, P. J. Blakeshear and J. C. Lawrence Jr.** (1995). Control of PHAS-I by insulin in 3T3-L1 adipocytes. Synthesis, degradation, and phosphorylation by a rapamycin-sensitive and mitogen-activated protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem.* 270(31):18531-8.
- Linzer D. I. H. and A. J. Levine** (1979). Characterization of a 54 K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.
- Liu Z. and R. A. Butow** (1999). A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol.* 19(10):6720-8.
- Liu Z., T. Sekito, C. B. Epstein and R. A. Butow** (2001). RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO J.* 20, 7209–7219.

- Liu H., D. C. Radisky, C. M. Nelson, H. Zhang, J. E. Fata, R. A. Roth and M. J. Bissell.** (2006). Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4134-4139.
- Liu X. and X. F. Zheng** (2007). Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. *Mol. Biol. Cell* 18:1073-1082.
- Livingstone C., G. Patel and N. Jones** (1995). ATF-2 contains a phosphorylation-dependent transcriptional activation domain. *EMBO J.* 14, 1785–1797.
- 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* 10:457–468.
- Long X., Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa and J. Avruch** (2005). Rheb binds and regulates the mTOR Kinase. *Curr. Biol.* 15: 702-713.
- Long X., C. Spycher, Z. S. Han, A. M. Rose and F. Muller** (2002). TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Curr. Biol.* 12: 1448–1461.
- Long X., S. Ortiz-Vega, Y. Lin and J. Avruch** (2005). Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *J. Biol. Chem.* 280:23433-23436.
- Longtine M. S., A. McKenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, P. and J. R. Pringle** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- 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* 155:611-22.
- MacIver F. H., K. Tanaka, A. M. Robertson and I. M. Hagan** (2003). Physical and functional interactions between polo kinase and the spindle pole component Cut12 regulate mitotic commitment in *S. pombe*. *Genes Dev.* 17(12):1507-23.
- Madeo F., E. Fröhlich, M. Ligr, M. Grey, S. J. Sigrist, D. H. Wolf and K. U. Fröhlich** (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell. Biol.* 145(4):757-67.
- Maesaki R., T. Shimizu, K. Ihara, S. Kuroda, K. Kaibuchi and T. Hakoshima** (1999). Biochemical and crystallographic characterization of a Rho effector domain of the protein serine/threonine kinase N in a complex with RhoA. *J. Struct. Biol.* 126(2):166-70.
- Mahfouz M. M., S. Kim, A. J. Delauney and D. P. Verma** (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* 18(2):477-90.

- Mager W. H. and M. Siderius** (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res.* 2(3):251-7.
- Makino C., Y. Sano, T. Shinagawa, J. B. Millar and S. Ishii** (2006). Sin1 binds to both ATF-2 and p38 and enhances ATF-2-dependent transcription in an SAPK signaling pathway. *Genes Cells* 11(11):1239-51.
- 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 tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell.* 10:151–162.
- Martin P. M. and A. E. Sutherland** (2001). Exogenous amino acids regulate trophectoderm differentiation in the mouse blastocyst through an mTOR-dependent pathway. *Dev. Biol.* 240:182-193.
- Wu M. Y., M. Cully, D. Andersen and S. J. Leever** (2007). Insulin delays the progression of *Drosophila* cells through G2/M by activating the dTOR/dRaptor complex. *EMBO J.* 26(2):371-9.
- 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. Kubo, Y. Watanabe and M. Yamamoto** (2003). *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8pp forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *EMBO J.* 22: 3073–3083.
- 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, 3154–3164.
- Magasanik B.** (1992). Regulation of nitrogen utilization, p. 283-317. In E. W. Jones, J. R. Pringle and J. R. Broach (ed.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mayordomo I., E. Estruch and P. Sanz** (2002). Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 protein kinase pathways in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (Stress Response Element)-regulated genes. *J. Biol. Chem.* 277(38):35650-6.
- Meyuhas O., D. Avni and S. Shama** (1996). Translational control of ribosomal mRNAs in eukaryotes, in *Translational control*, J. W. B. Hershey, M. B. Mathews and N. Soneberg, eds (Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 363-388.
- Millar J. B. A., V. Buck and M. G. Wilkinson** (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* 9: 2117-2130.

- Miranda-Saavedra D. and G. J. Barton** (2007). Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins* 68, 893–914.
- Morice W. G., G. Wiederrecht, G. J. Brunn, J. J. Siekierka and R. T. Abraham** (1993). Rapamycin inhibition of interleukin-2-dependent p33cdk2 and p34cdc2 kinase activation in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 268(30):22737-45.
- Moser B. A., J. M. Brondello, B. Baber-Furnari and P. Russell** (2000). Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Mol Cell Biol* 20, 4288-4294.
- Motti M. L., C. De Marco, D. Califano, A. Fusco and G. Viglietto** (2004). Akt-dependent T198 phosphorylation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in breast cancer. *Cell Cycle* 3(8):1074-80.
- Mulvihill D. P., J. Petersen, H. Ohkura, D. M. Glover and I. M. Hagan** (1999). Plol1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* 10, 2771–2785.
- Munn A. L.** (2001). Molecular requirements for the internalisation step of endocytosis: insights from yeast. *Biochem. Biophys. Acta.* 1535(3):236-57.
- Murakami M., T. Ichisaka and M. Maeda** (2004). mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 24:6710-6718.
- Nakagawa C. W., N. Mutoh and Y. Hayashi** (1995). Transcriptional regulation of catalase gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: molecular cloning of the catalase gene and northern blot analyses of the transcript. *J. Biochem.* 118(1):109-16.
- Nakase Y., K. Fukuda, Y. Chikashige, C. Tsutsumi and D. Morita** (2006). A defect in protein farnesylation suppresses a loss of *Schizosaccharomyces pombe tsc2⁺*, a homolog of the human gene predisposing tuberous sclerosis complex. *Genetics* 173: 569–578.
- Nakashima N., E. Noguchi and T. Nishimoto** (1999). *Saccharomyces cerevisiae* putative G protein, Gtr1p, which forms complexes with itself and a novel protein designated as Gtr2p, negatively regulates the Ran/Gsp1p G protein cycle through Gtr2p. *Genetics* 152(3):853-67.
- Nandi P. K., K. Prasad, R. E. Lippoldt, A. Alfsen and H. Edelhoch** (1982). Reversibility of coated vesicle dissociation. *Biochemistry* 21(25):6434-40.
- Nelson K.K. and S. K. Lemmon** (1993). Suppressors of clathrin deficiency: overexpression of ubiquitin rescues lethal strains of clathrin-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13(1):521-32.
- Nojima H., C. Tokunaga, S. Eguchi, N. Oshiro, S. Hidayat, K. Yoshino, K. Hara, N. Tanaka, J. Avruch and 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.* 278:15461–15464.

- Nolen B., S. Taylor and G. Ghosh** (2004). Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation. *Mol. Cell* 15, 661–675.
- Nourse J., E. Firpo, W. M. Flanagan, S. Coats, K. Polyak, M. H. Lee, J. Massague, G. R. Crabtree and J. M. Roberts** (1994). Interleukin-2-mediated elimination of the p27kip1 cyclin- dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372, 570–573.
- Ochotorena I. L., D. Hirata, K. Kominami, J. Potashkin, F. Sahin, K. Wentz-Hunter, K. L. Gould, S. Kazuhito, Y. Yoshida, L. Vardy and T. Toda** (2001). Conserved Wat1p/Pop3 WD-repeat protein of fission yeast secures genome stability through microtubule integrity and may be involved in mRNA maturation. *Journal of Cell Science* 114: 2911-2920.
- Ohmiya R., H. Yamada, K. Nakashima, H. Aiba and T. Mizuno** (1995). Osmoregulation of fission yeast: cloning of two distinct genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase, one of which is responsible for osmotolerance for growth. *Mol. Microbiol.* 18(5):963-73.
- 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: 2689–2694.
- Oshiro N., K. Yoshino and S. Hidayat** (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 9:359-366.
- Oshiro N., R. Takahashi and K. Yoshino** (2007). The proline-Rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mTOR complex 1. *J. Biol. Chem.* 282:20329-20339.
- Palmer R. H., J. Ridden and P. J. Parker** (1995). Cloning and expression patterns of two members of a novel protein-kinase-C-related kinase family. *Eur. J. Biochem.* 227(1-2):344-51.
- Parekh D., W. Ziegler, K. Yonezawa, K. Hara and P. J. Parker** (1999). Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKC δ and nPKC ϵ . *J. Biol. Chem.* 274, 34758–34764.
- Parrott L. A. and D. J. Templeton** (1999). Osmotic stress inhibits p70/85 S6 kinase through activation of a protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274(35):24731-6.
- Patel S., J. Van Der Kaay and C. Sutherland** (2002) Insulin regulation of hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1) gene expression and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling is impaired by the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 365(Pt 2):537-45.
- Pause A., N. Méthot, Y. Svitkin, W. C. Merrick and N. Sonenberg** (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J.*13(5):1205-15.

- Payne G. S., T. B. Hasson, M. S. Hasson and R. Schekman** (1987). Genetic and biochemical characterization of clathrin-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 7(11):3888-98.
- Payne G. S. and R. Schekman** (1989). Clathrin: a role in the intracellular retention of a Golgi membrane protein. *Science (Wash. DC)* 245:1358-1365.
- Pearson R. B., P. B. Dennis, J. W. Han, N. A. Williamson, S. C. Kozma, R. E. Wettenhall and G. Thomas** (1995). The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J.* 14, 5279–5287.
- Peng T., T. R. Golub and D. M. Sabatini** (2002). The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell Biol.* 22, 5575-5584.
- Perry J. and N. Kleckner** (2003). The ATRs, ATMs, and TORs are giant HEAT repeat proteins. *Cell* 112, 151–155.
- Persengiev S. P. and M. R. Green** (2003). The role of ATF/CREB family members in cell growth, survival and apoptosis. *Apoptosis* 8(3):225-8.
- Petersen J. and I. M. Hagan** (2005). Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature* 435:507–12.
- 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, 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.* 275:7416-7423.
- Pidoux A. L., E. H. Fawell and J. Armstrong** (1990). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase homologue from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* 18(23):7145.
- Potter C. J., L. G. Pedraza and T. Xu** (2002). Akt regulates growth by directly phosphorylating TSC2. *Nat. Cell Biol.* 4:658–665.
- Price D. J., J. R. Grove, V. Calvo, J. Avruch and B. E. Bierer** (1992) Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 257, 973–977.
- Qualmann B. and H. Mellor** (2003). Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem. J.* 371(Pt 2):233-41.
- Redpath N. T., N. T. Price and C. G. Proud** (1996). Cloning and expression of cDNA encoding protein synthesis elongation factor-2 kinase. *J. Biol. Chem.* 271(29):17547-54.
- Reinke A., S. Anderson and J. M. McCaffery** (2004). TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279:14752-14762.

- Roberg K. J., S. Bickel, N. Rowley and C. A. Kaiser** (1997). Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8. *Genetics* 147, 1569–1584.
- Robzyk K. and Y. Kassir** (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res* 20: 3790.
- Rothman J. E. and R. E. Fine** (1980). Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(2):780-4.
- 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. USA* 101, 13489-13494.
- Ruis H and C. Schüller** (1995). Stress signaling in yeast. *Bioessays* 17(11):959-65.
- Sabatini D.M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst and S. H. Snyder** (1994). RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78:35-43.
- Sabers C. J., M. M. Martin and G. J. Brunn** (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 270:815-822.
- Saitoh M., N. Pullen, P. Brennan, D. Cantrell, P. B. Dennis and G. Thomas** (2002). Regulation of an activated s6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J Biol Chem* 277: 20104–20112.
- Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). Molecular Cloning- A Laboratory Manual. 2nd Edn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Samejima I., S. Mackie, E. Warbrick, R. Weisman and P. A. Fantes** (1998). The fission yeast mitotic regulator *win1*⁺ encodes an MAP kinase kinase kinase that phosphorylates Wis1 MAP kinase kinase in response to high osmolarity. *Mol. Biol. Cell.* 9: 2325-2335.
- Sancak Y., C. C. Thoreen and T. R. Peterson** (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell.* 25:903-915.
- 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.
- Santhanam A., A. Hartley, K. Düvel, J. R. Broach and S. Garrett** (2004). PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryot. Cell* 3(5):1261-71.
- Sarbassov dos 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 raptorindependent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14:1296–1302.

- Sarbassov D. D., S. M. Ali and D. M. Sabatini** (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 17:596-603.
- 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* 307:1098-1101.
- Sarbassov D. D., S. M. Ali and S. Sengupta** (2006). Prolonged Rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell.* 22:159-168.
- Sarbassov D. D. and D. M. Sabatini** (2005). Redox regulation of the nutrient-sensitive raptor-mTOR pathway and complex. *J. Biol. Chem.* 280(47):39505-9.
- 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.
- 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.
- Sayers L. G., S. Katayama, K. Nakano, H. Mellor, I. Mabuchi, T. Toda and P. J. Parker** (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells* 5(1):17-27.
- Schalm S. S. and J. Blenis** (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr. Biol.* 12:632-639.
- Schalm S. S., D. C. Fingar, D. M. Sabatini and J. Blenis** (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr. Biol.* 13:797-806.
- Scheid M. P., P. A. Marignani and J. R. Woodgett** (2002). Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol. Cell. Biol.* 22:6247-6260.
- Schmelzle T. and M. N. Hall** (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103(2):253-62.
- Schmelzle T., S. B. Helliwell and M. N. Hall** (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 22:1329-1339.
- Schmidt A., J. Kunz and M. N. Hall** (1996). TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3780-13785.
- Schmidt A., M. Bickle, T. Beck and M. N. Hall** (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88:531-542.
- Schmidt A., T. Beck, A. Koller, J. Kunz and M. N. Hall** (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.* 17:6924-6931.

- Schmitt A. P. and K. McEntee** (1996). Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(12):5777-82.
- Schmitz H. P., A. Lorberg and J. J. Heinisch** (2002). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol. Microbiol.* 44(3):829-40.
- Schneider A., R. H. Younis and J. S. Gutkind** (2008). Hypoxia-induced energy stress inhibits the mTOR pathway by activating an AMPK/REDD1 signaling axis in head and neck squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 10(11):1295-302.
- Schook W., S. Puszkin, W. Bloom, C. Ores and S. Kochwa** (1979). Mechanochemical properties of brain clathrin: interactions with actin and alpha-actinin and polymerization into basketlike structures or filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(1):116-20.
- Schroder W., N. Cloonan, G. Bushell and T. Sculley** (2004). Alternative polyadenylation and splicing of mRNAs transcribed from the human Sin1 gene. *Gene* 339:17-23.
- Schroder W., G. Bushell and T. Sculley** (2005). The human stress-activated protein kinase-interacting 1 gene encodes JNK-binding proteins. *Cell. Signal.* 17, 761–767.
- Schroder W. A., M. Buck and N. Cloonan** (2007). Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell. Signal.* 19:1279-1289.
- Sekiguchi T., E. Hirose, N. Nakashima, M. Ii and T. Nishimoto** (2001). Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J. Biol. Chem.* 276(10):7246-57.
- Shah O. J. and T. Hunter** (2006). Turnover of the Active Fraction of IRS1 Involves Raptor-mTOR- and S6K1-Dependent Serine Phosphorylation in Cell Culture Models of Tuberous Sclerosis. *Mol Cell Biol.* 26:6425–6434.
- Shaw R. J., N. Bardeesy and B. D. Manning** (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6:91-99.
- Shibata H., H. Mukai, Y. Inagaki, Y. Homma, K. Kimura, K. Kaibuchi, S. Narumiya and Y. Ono** (1996). Characterization of the interaction between RhoA and the amino-terminal region of PKN. *FEBS Lett.* 385(3):221-4.
- Shieh J. C., M. G. Wilkinson, V. Buck, B. Morgan, K. Makino and J. B. A. Millar** (1997). The Mcs4 response regulator co-ordinately controls the stress activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and the fission yeast cell cycle. *Genes Dev.* 11: 1008-1022.
- Shikata M., F. Ishikawa and J. Kanoh** (2007). Tel2 is required for activation of the Mrc1-mediated replication checkpoint. *J. Biol. Chem.* 282(8):5346-55.
- Shimoda C., M. Uehira, M. Kishida, H. Fujioka, Y. Iino, Y. Watanabe and M. Yamamoto**

(1987). Cloning and analysis of transcription of the *mei2* gene responsible for initiation of meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol.* 169(1):93-6.

Shin I., F. M. Yakes, F. Rojo, N. Y. Shin, A. V. Bakin, J. Baselga and C. L. Arteaga (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med.* 8(10):1145-52.

Shiozaki K. and P. Russel (1995). Cell cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378: 739-743.

Shiozaki K. and P. Russel (1996). Conjugation, meiosis and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* 10: 2276-2288.

Shinozaki-Yabana S., Y. Watanabe and M. Yamamoto (2000). Novel WD-Repeat protein MIP1 facilitates function of the meiotic regulator MEI2 in fission yeast. *Mol. and Cell. Biol.* 20 No.4: 1234-1242.

Silveira L. A., D. H. Wong, F. R. Masiarz and R. Schekman (1990). Yeast clathrin has a distinctive light chain that is important for cell growth. *J. Cell. Biol.* 111(4):1437-49.

Slater A. F., C: S. Nobel and S. Orrenius (1995). The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1271(1):59-62.

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.* 280:18717-18727.

Smith E. M. and C. G.Proud (2008). Cdc2-cyclin B regulates eEF2 kinase activity in a cell cycle- and amino acid-dependent manner. *EMBO J.* 27(7):1005-16.

Smith A., M. P. Ward and S. Garrett (1998). Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17(13):3556-64.

Snell V. and P. Nurse (1994). Genetic analysis of cell morphogenesis in fission yeast--a role for casein kinase II in the establishment of polarized growth. *EMBO J.* 13(9):2066-74.

Sofer A., K. Lei, C. M. Johannessen and L. W. Ellisen (2005). Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol. Cell. Biol.* 25(14):5834-45.

Sorsoli W. A., K. D. Spence and L. W. Parks (1964). Amino acid accumulation in methionine-resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 88, 20-24.

Soucek T., M. Rosner, A. Milolozza, 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):4904-9.

- Stan R., M. M. McLaughlin, R. Cafferkey, R. K. Johnson, M. Rosenberg and G. P. Livi** (1994). Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J. Biol. Chem.* 269:32027–32030.
- Stephens L., K. Anderson, D. Stokoe, H. Erdjument-Bromage, G. F. Painter, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, F. McCormick, P. Tempst, J. Coadwell and P. T. Hawkins** (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279(5351):710-4.
- 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.
- Sturgill T. W., A. Cohen, M. Diefenbacher, M. Trautwein, D. Martin and M. N. Hall** (2008). TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. *Eukaryot. Cell* 10, 1819–1830.
- Sugimoto A., Y. Iino, T. Maeda, Y. Watanabe and M. Yamamoto** (1991). *Schizosaccharomyces pombe ste11* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev.* 5:1990–1999.
- Sun X. J., P. Rothenberg, C. R. Kahn, J. M. Backer, E. Araki, P. A. Wilden, D. A. Cahill, B. J. Goldstein and M. F. White** (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352(6330):73-7.
- Symons M. and N. Rusk** (2003). Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr. Biol.* 13(10):R409-18.
- Tabancay Jr A. P., 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.* 278:39921-30.
- Tabuchi M., A. Audhya, A. B. Parsons, C. Boone and S. D. Emr** (2006) The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5861–5875.
- Takahashi T., K. Hara, H. Inoue, Y. Kawa, C. Tokunaga, S. Hidayat, K. Yoshino, Y. Kuroda and K. Yonezawa** (2000). Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function *in vivo* and *in vitro*. *Genes Cells* 5, 765–77.
- Takahashi K., H. Yamada and M. Yanagida** (1994). Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Mol. Biol. Cell* 5(10):1145-58.
- Takeda T., T. Toda, K. Kominami, A. Kohnosu, M. Yanagida and N. Jones** (1995). *Schizosaccharomyces pombe atf1p* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J.* 14, 6193–6208.

- Takuwa N. and Y. Takuwa** (1997). Ras activity late in G1 phase required for p27kip1 downregulation, passage through the restriction point, and entry into S phase in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 17(9):5348-58.
- 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.
- Thedieck K., P. Polak, M. L. Kim, K. D. Molle, A. Cohen, P. Jenö, C. Arriemerlou and M. N. Hall** (2007). PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS ONE*, 2, e1214.
- Tocci M. J., D. A. Matkovich, K. A. Collier, P. Kwok, F. Dumont, S. Lin, S. Degudicibus, J. J. Siekierka, J. Chin and N. I. Hutchinson** (1989): The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J. Immunol.* 143(2):718-26.
- Toda T., M. Shimanuki and M. Yanagida** (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast *FUS3* and *KSS1* kinases. *Genes Dev.* 5:60–73.
- Toone W. M., S. Kuge, M. Samuels, B. A. Morgan, T. Toda and N. Jones** (1998). Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Cm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1. *Genes Dev.* 12: 1453-1463.
- Tsutakawa S. E., K. F. Medzihradzsky, A. J. Flint, A. L. Burlingame and D. E. Koshland Jr.** (1995). Determination of in vivo phosphorylation sites in protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270(45):26807-12.
- Tzatsos A.** (2009). Raptor binds the SAIN (Shc and IRS-1 NPXY binding) domain of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and regulates the phosphorylation of IRS-1 at Ser-636/639 by mTOR. *J. Biol. Chem.* 284(34):22525-34.
- Tzatsos A and K. V. Kandrór** (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 26(1):63-76.
- Ungewickell E. and D. Branton** (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289(5796):420-2.
- 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, 11198–11206.
- 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. Microbiology* 58: 1074-1086.

Urban J., A. Soulard, A. Huber, S. Lippman, D. Mukhopadhyay, O. Deloche, V. Wanke, D. Anrather, G. Ammerer and H. Riezman (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 26, 663–674.

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 Dam H., D. Wilhelm, I. Herr, A. Steffen, P. Herrlich and P. Angel (1995) Atf-2 is preferentially activated by stressactivated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *EMBO J.* 14, 1798–1811.

Van der Haar E., S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin TJ and D. H. Kim (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9:316-323.

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.* 279:12706-13.

van Slegtenhorst M., R. de Hoogt, C. Hermans, M. Nellist, B. Janssen, S. Verhoef, D. Lindhout, A. van den Ouweland, D. Halley, J. Young, M. Burley, S. Jeremiah, K. Woodward, J. Nahmias, M. Fox, R. Ekong, J. Osborne, J. Wolfe, S. Povey, R. G. Snell, J. P. Cheadle, A. C. Jones, M. Tachataki, D. Ravine, J. R. Sampson, M. P. Reeve, P. Richardson, F. Wilmer, C. Munro, T. L. Hawkins, T. Sepp, J. B. Ali, S. Ward, A. J. Green, J. R. Yates, J. Kwiatkowska, E. P. Henske, M. P. Short, J. H. Haines, S. Jozwiak, and D. J. Kwiatkowski (1997). Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. *Science* 277: 805-8.

Varela J. C., U. M. Praekelt, P. A. Meacock, R. J. Planta and W. H. Mager (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol. Cell Biol.* 15(11):6232-45.

Veverka V., T. Crabbe, I. Bird, G. Lennie, F. W. Muskett, R. J. Taylor and M. D. Carr (2008) Structural characterization of the interaction of mTOR with phosphatidic acid and a novel class of inhibitor: compelling evidence for a central role of the FRB domain in small molecule-mediated regulation of mTOR. *Oncogene* 27(5):585-95.

Vézina C., A. Kudelski and S. N. Sehgal (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28(10):721-6.

Vieira, J. and J. Messing (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* 100, 189-194.

Viglietto G., M. L. Motti, P. Bruni, R. M. Melillo, A. D'Alessio, D. Califano, F. Vinci, G. Chiappetta, P. Tsihchis and A. Bellacosa (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat. Med.* 8, 1136–1144.

- Wang L., J. C. Lawrence Jr, T. W. Sturgill and T. E. Harris** (2009). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activity is associated with phosphorylation of raptor by mTOR. *J. Biol. Chem.* 284(22):14693-7.
- Wang L., C. J. Rhodes and J. C. Lawrence Jr** (2006). Activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by insulin is associated with stimulation of 4EBP1 binding to dimeric mTOR complex 1. *J. Biol. Chem.* 281:24293-303.
- Wang L., T. E. Harris, R. A. Roth and J. C. Lawrence Jr.** (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* 282:20036-20044.
- Wang S. Z. and R. M. Roberts** (2004). Interaction of stress-activated protein kinase-interacting protein-1 with the interferon receptor subunit IFNAR2 in uterine endometrium. *Endocrinology* 145(12):5820-31.
- Wang S. Z. and R. M. Roberts** (2005). The evolution of the Sin1 gene product, a little known protein implicated in stress responses and type I interferon signaling in vertebrates. *BMC Evol. Biol.* 5:13.
- E. Warbrick and P. Fantes** (1991). The Wis1 protein kinase is a dose-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 10: 4291-4299.
- Watanabe Y., Y. Iino, K. Furuhashi, C. Shimoda and M. Yamamoto** (1988). The *S. pombe* *Mei2p* gene encoding a crucial molecule for commitment to meiosis is under the regulation of cAMP. *EMBO J.* 7:761-767.
- Watanabe Y., S. Shinozaki-Yabana, Y. Chikashige, Y. Hiraoka and M. Yamamoto** (1997). Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast. *Nature* 386:187-190.
- Wedaman K. P., A. Reinke, S. Anderson, J. Yates, J. M. McCaffery and T. Powers** (2003). Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14:1204-20.
- 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.
- 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: 7027-7032.
- Weisman R., S. Finkelstein and M. Choder** (2001) Rapamycin blocks sexual development in fission yeast through inhibition of the cellular function of an FKBP12 homolog. *J. Biol. Chem.* 276: 24736-24742.
- Weisman R.** (2004). The fission yeast TOR proteins and the rapamycin response: an unexpected tale. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279: 85-95.
- 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., I. Roitburg, M. Schonbrun, R. Harari and M. Kupiec** (2007). Opposite effects of tor1 and tor2 on nitrogen starvation responses in fission yeast. *Genetics* 175:1153-62.
- White MF** (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283(3):E413-22.
- Wienecke R., J. C. Maize Jr, F. Shoarinejad, W. C. Vass, J. Reed, J. S. Bonifacino, J. H. Resau, J. de Gunzburg, R. S. Yeung and J. E. DeClue** (1996). Co-localization of the TSC2 product tuberlin with its target Rap1 in the Golgi apparatus. *Oncogene* 13(5):913-23.
- Wilkinson M. G., M. Samuels, T. Takeda, T. Toda, M. W. Toone, J.-C. Shieh, J. B. A. Millar and N. C. Jones** (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* 10(18):2289-301.
- Wilkinson M. G., T. S. Pino, S. Tournier, V. Buck, H. Martin, J. Christiansen, D. G. Wilkinson and J. B. A. Millar** (1999). Sin1p: an evolutionary conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J.* 18: 4210-4221.
- Wojda I., R. Alonso-Monge, J. P. Bebelman, W. H. Mager and M. Siderius** (2003). Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways. *Microbiology* 149(Pt 5):1193-204.
- Woo S. Y., D. H. Kim, C. B. Jun, Y. M. Kim, E. V. Haar, S. I. Lee, J. W. Hegg, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D. H. Kim** (2007). PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J. Biol. Chem.* 282(35):25604-12.
- Woodward M. P. and T. F. Roth** (1978). Coated vesicles: characterization, selective dissociation, and reassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75(9):4394-8.
- Wullschlegel S, R. Loewith, W. Oppliger and M. N. Hall** (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J. Biol. Chem.* 280:30697-30704.
- Yang W., A. P. Tabancay Jr., J. Urano and 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.* 41:1339-47.
- Yang J., P. Cron, V. Thompson, V. M. Good, D. Hess, B. A. Hemmings and D. Barford** (2002) Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol. Cell* 9, 1227–1240.
- Yang Q., K. Inoki, E. Kim and K. L. Guan** (2006) TSC1/TSC2 and Rheb have different effects on TORC1 and TORC2 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:6811-6816.
- Yang Q. and K. L. Guan** (2007) Expanding mTOR signalling. *Cell Res.* 17, 666-681.

- 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: 103-19.
- Yonemoto W., M. L. McGlone., B. Grant and S. S. Taylor** (1997). Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Protein Eng.* 10, 915–925.
- Young K. H.** (1998). Yeast two-hybrid: so many interactions, (in) so little time... . *Biol. Reprod.* 58(2):302-11.
- Young P. G. and P. A. Fantes** (1987). *Schizosaccharomyces pombe* mutants affected in their division response to starvation. *J. Cell Sci.* 88(3): 295–304.
- Young K., S. Lin, L. Sun, E. Lee, M. Modi, S. Hellings, M. Husbands, B. Ozenberger and R. Franco** (1998). Identification of a calcium channel modulator using a high throughput yeast two-hybrid screen. *Nat. Biotechnol.* 16(10):946-50.
- Zhang Y., C. J. Billington Jr, D. Pan and T. P. Neufeld** (2006). Drosophila target of rapamycin kinase functions as a multimer. *Genetics* 172(1):355-62.
- 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 tumor suppressor proteins. *Nat. Cell Biol.* 5:578–581.
- 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* 24:185–197.
- 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: 2712–2724.
- Zhang X., L. Shu, H. Hosoi, K. G. Murit and P. J. Houghton** (2002). Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J. Biol. Chem.* 277, 28127-28134.
- Zhao H., K. Tanaka, E. Nogochi, C. Nogochi and P. Russel** (2003). Replication checkpoint protein Mrc1 is regulated by Rad3 and Tel1 in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 23(22):8395-403.
- Zheng X. F., D. Florentino, J. Chen, G. R. Crabtree GR and S. L. Schreiber** (1995). TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell* 82(1):121-30.

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 und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich / unentgeltlich geholfen.

1. Die Ko-Immünpräzipitationen erfolgten zum Teil 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 oder mittelbar 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)