



**Plasmamembran-assoziiertes Adaptorprotein Ste50  
moduliert G-Protein und MAP Kinasen Signaling in der  
Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**vorgelegt von**  
Nicolas Arnold Bernsmeier  
aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2009

aus dem Institut für Mikrobiologie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Massoud Ramezani Rad  
Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2009

Diese Arbeit wurde durch die Promotionsförderung der Konrad-Adenauer-Stiftung unterstützt.

**Fragen ist die Frömmigkeit des Denkens**

Martin Heidegger

**Omnis mundi creatura  
quasi liber et pictura  
nobis est et speculum**

Alanus ab Insulis



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>MAPK Signalwege in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Der Pheromon-Antwortweg .....	3
1.1.2	Der filamentöse-Wachstumsweg .....	5
1.1.3	Der Hochosmolare Antwortweg .....	8
<b>1.2</b>	<b>Das regulatorische Adaptorprotein Ste50 .....</b>	<b>10</b>
1.2.1	Struktur und Funktion des Proteins Ste50 .....	10
1.2.2	Die Struktur und Funktion der SAM-Domäne von Ste50 .....	12
1.2.3	Die Serin/Threonin reiche Region von Ste50 .....	14
1.2.4	Die Struktur und Funktion der RA-Domäne von Ste50 .....	15
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL &amp; METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>19</b>
2.1.1	Hefestämme und Medien .....	19
2.1.1.1	Hefestämme .....	19
2.1.1.2	Medien für Hefe .....	21
2.1.2	<i>Escherichia coli</i> Stämme und Medien .....	21
2.1.2.1	<i>E. coli</i> Stämme .....	21
2.1.2.2	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	21
2.1.3	Plasmide und Oligonukleotide .....	22
2.1.3.1	Plasmide .....	22
2.1.3.2	Oligonukleotide (Primer) .....	25
2.1.4	Chemikalien und Antikörper .....	26
2.1.4.1	Antikörper .....	26
2.1.4.2	Chemikalien .....	27
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.2.1	Amplifikation von DNA mittels PCR (Polymerase Chain Reaktion) .....	28
2.2.1.1	Amplifikation von Plasmid-DNA .....	28
2.2.1.2	PCR von Zellen .....	29
2.2.2	Gen Deletion in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
2.2.3	Transformation .....	30
2.2.3.1	Transformationen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
2.2.3.2	Transformationen in <i>E. coli</i> .....	31
2.2.4	Präparation von Nukleinsäuren .....	32
2.2.4.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	32
2.2.4.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
2.2.4.3	Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	33
2.2.4.6	DNA-Restriktion .....	34
2.2.4.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	34
2.2.4.8	Ligation von DNA-Fragmenten .....	34
2.2.5	Proteinbiochemische Methoden .....	34
2.2.5.1	Herstellung von Proteinrohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> .....	34
2.2.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford .....	35
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	35
2.2.5.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblot) .....	35
2.2.5.5	Detektion durch Alkalische Phosphatase .....	36
2.2.5.6	Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit ONPG .....	36

2.2.6	Weitere Methoden .....	37
2.2.6.1	Two-Hybrid-Interaktionsnachweis .....	37
2.2.6.2	Induktion des Paarungspheromon-Antwortweges mit $\alpha$ -Faktor... ..	38
2.2.6.3	Sensitivitätstest gegenüber Paarungspheromon .....	38
2.2.6.4	Sensitivitätstest gegenüber Hyperosmolarität .....	38
2.2.6.5	Induktion des pseudohyphalen Antwortweges.....	38
2.2.6.6	Induktion des Signalweges für Invasives Wachstum in Flüssigmedium .....	38
2.2.6.7	Induktion des Signalweges für Invasives Wachstum in Festmedium .....	39
2.2.6.8	Fluoreszenzmikroskopie .....	39
2.2.6.9	Bioinformatik.....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur Funktionalität von Ste50-RA Mutanten in den MAPK Signalwegen .....</b>	<b>40</b>
3.1.1	Auswirkung der RA- Mutanten auf den Hochosmolaren Antwortweg ..	42
3.1.2	Auswirkung der RA-Mutanten auf den Pheromon-Antwortweg .....	43
3.1.2.1	Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen der Zelle und dem G1-Zellzyklus-Arrest nach Behandlung mit $\alpha$ -Faktor ....	44
3.1.1.1	Untersuchung zum Einfluss der Ste50 Mutanten auf die Expression des Reportergens <i>FUS1-lacZ</i> .....	46
3.1.2	Auswirkung der RA-Mutanten auf den Crosstalk zwischen HOG- Signalweg und dem Pheromon-Antwortweg .....	48
3.1.3	Auswirkung der RA-Mutanten auf den filamentösen Wachstumsweg ..	49
3.1.3.1	Invasives Wachstum auf festem Medium.....	49
3.1.3.2	Expression von <i>FLO11-lacZ</i> .....	51
<b>3.2</b>	<b>Analyse der RA-Domänen abhängigen Interaktionen von Ste50 .....</b>	<b>53</b>
3.2.1	Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Ras2 .....	53
3.2.2	Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Ras1 .....	56
3.2.3	Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Cdc42 .....	57
3.2.4	Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Opy2 .....	58
<b>3.3</b>	<b>Plasmamembranrekrutierung von Ste50-<math>\Delta</math>RAD.....</b>	<b>59</b>
3.3.1	Erstellung von Plasmamembran assoziiertem Ste50- $\Delta$ RA .....	60
3.3.2	Untersuchungen zur Funktion von plasmamembranrekrutiertem Ste50- $\Delta$ RAD im Hochosmolaren Antwortweg .....	61
3.3.2.1	nSte50FAR kann den Wachstumsdefekt einer <i>STE50</i> Deletion und einer <i>OPY2</i> Deletion im HOG-Signalweg komplementieren ..	62
3.3.2.2	nSte50FAR kann den Wachstumsdefekt einer <i>SHO1</i> Deletion im HOG-Signalweg nicht komplementieren .....	64
3.3.2.3	<i>nste50FAR</i> zeigt eine eine Abschwächung der Aktivierung von <i>CRE-lacZ</i> nach Salzstress.....	66
3.3.2.4	Reduzierter Crosstalk zwischen HOG-Signalweg und Pheromonantwort durch plasmamembranrekrutiertes nSte50 ....	69
3.3.3	Untersuchungen zur Funktion von Plasma-membranrekrutiertem Ste50- $\Delta$ RAD in der Pheromonantwort.....	70
3.3.3.1	Haloassay zur Analyse der Adaption an Pheromon.....	70
3.3.3.2	Expression von <i>FUS1-lacZ</i> .....	72
3.3.3.3	Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen und dem G1-Zellzyklus-Arrest nach Induktion mit $\alpha$ -Faktor .....	76

3.3.4	Untersuchungen zur Funktion von plasmamembran-rekrutiertem Ste50- $\Delta$ RAD im filamentösen Wachstumsweg .....	78
3.3.4.1	Induktion von pseudohyphalem Wachstum in diploiden Zellen ...	78
3.3.4.2	Auswirkung von membranrekrutiertem <i>nste50FAR</i> auf die Transkription des Reportergens <i>FG(TyA)-lacZ</i> .....	80
3.3.4.4	Eigenschaften von <i>nste50FAR</i> in der Adhäsion haploider Zellen..	82
3.3.4.5	<i>nste50FAR</i> führt zu einer verstärkten Expression des Reportergens <i>FLO11-lacZ</i> in stationären Zellen .....	83
3.3.4.6	Adhäsion von haploiden Zellen bei Überexpression von Hyperaktivem Ras2 <sup>val19</sup> .....	85
3.3.4.7	Expression des Reportergens <i>FLO11-lacZ</i> in haploiden Zellen bei Überexpression von Hyperaktivem Ras2 <sup>val19</sup> .....	87
3.3.4.8	Adhäsion von haploiden Zellen bei Überexpression der PKA Untereinheit Tpk1 .....	88
3.3.4.9	Expression des Reportergens <i>FLO11-lacZ</i> in haploiden Zellen bei Überexpression der katalytischen PKA Untereinheit Tpk1 .....	90
3.3.4.10	Der Ste50-MAPK-Signalweg, kann Adhäsion unabhängig von Flo8 vermitteln .....	91
3.3.5	Lokalisierung von nSte50FAR während der Signaltransduktion .....	93
3.3.5.1	Lokalisierung von GFP-nSte50FAR.....	93
3.3.5.2	Verteilungsmuster von GFP-nSte50FAR bei osmotischem Stress an der Plasmamembran .....	95
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>97</b>
<b>4.1</b>	<b>Die RA-Domäne von Ste50 ist essentiell für die Funktion von Ste50 in mehreren MAPK-vermittelten Signalwegen ..</b>	<b>97</b>
<b>4.2</b>	<b>Modulation von MAPK Signalwegen durch das Adaptorprotein Ste50.....</b>	<b>100</b>
4.2.1	Plasmamembrantargeting von Ste50- $\Delta$ RA stellt die Funktion als regulatorischer Adaptor im Hochosmolaren Antwortweg wieder her	101
4.2.2	In der Antwort auf Paarungspheromon schwächt eine Plasmamembranrekrutierung von Ste50- $\Delta$ RA die Wirkung als positiver Modulator ab.....	105
4.2.3	Plasmamembranrekrutierung von Ste50 führt zu einer verstärkten Induktion des invasiven Wachstums.....	107
<b>4.3</b>	<b>Verteilungsmuster von nSte50FAR an der Plasmamembran während der Signaltransduktion .....</b>	<b>110</b>
<b>4.4</b>	<b>Ste50 als regulatorischer Adaptor im invasiven Wachstumsweg – Ein Modell .....</b>	<b>112</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>REFERENZEN.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>126</b>



# 1 EINLEITUNG

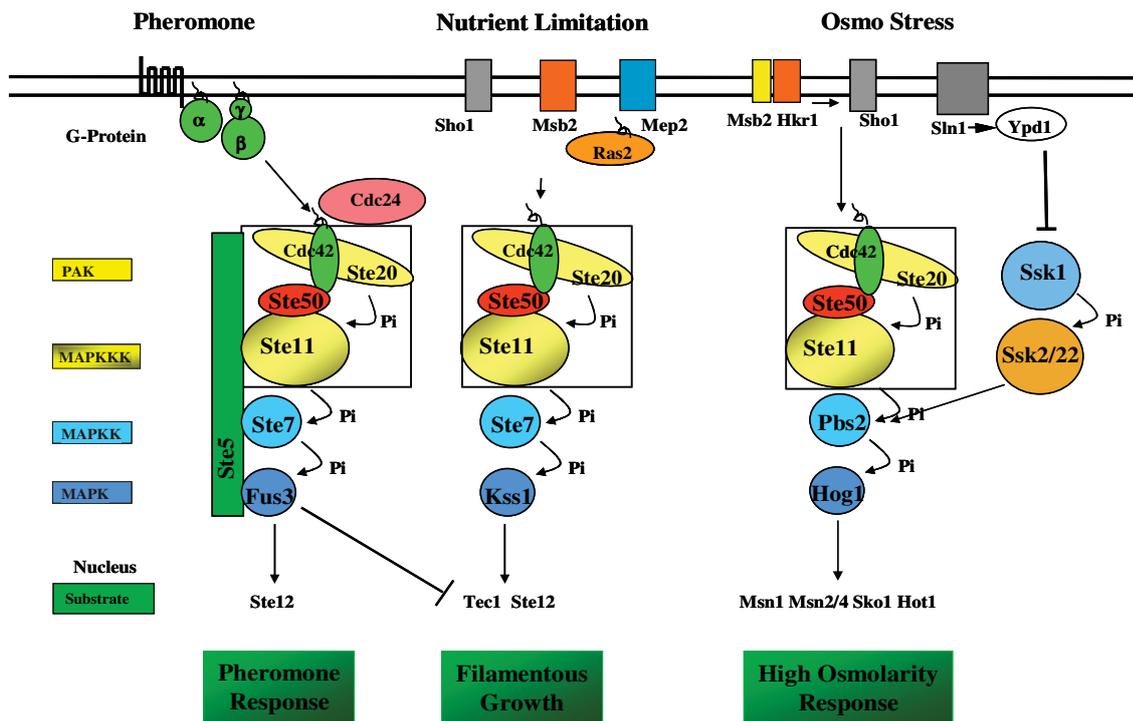
## 1.1 MAPK Signalwege in *Saccharomyces cerevisiae*

Eine fundamentale Eigenschaft von lebenden Zellen ist, Veränderungen in Ihrer Umwelt wahrzunehmen und adäquat zu reagieren. Dies trifft sowohl bei höheren Organismen als auch bei einzelligen Organismen zu. Obwohl es eine Vielzahl von verschiedenen Signalen gibt, die sich in ihrer Art und Dauer sehr stark unterscheiden, ist die Signalweiterleitung in ihren Grundlagen stark konserviert. Auf der Zelloberfläche (Zellmembran) gibt es spezielle Rezeptoren, die das Signal spezifisch erkennen und ins Zellinnere vermitteln. Es folgt die Signalweiterleitung in der Zelle, an deren Ende durch die Signalantwort meist Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die auch die Expression der Zielgene zur Antwort auf das Signal kontrollieren.

Ein häufig verwendeter molekularer Mechanismus um eine Antwort auszulösen, ist die dreistufige Kaskade von Proteinkinasen, die als Mitogen activated-protein-kinase (MAPK) Kaskade bekannt ist (Widmann *et al.*, 1999) Unser heutiges Verständnis von MAPK Signalwegen basiert zu einem großen Teil auf der Forschung, die an dem einzelligen Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt wurde. Ein großer Teil der beteiligten Komponenten und der Mechanismus mit dem sie operieren, wurde zuerst in diesem Modelorganismus gefunden und charakterisiert. Es zeigt sich, dass viele Signalwege in der Evolution erhalten geblieben und bei fast allen Eukaryonten vorzufinden sind.

Der konservierte MAPK Signalweg besteht aus einer dreiteiligen Kaskade mit einer aktivierten MAPK-Kinase-Kinase, die eine MAPK-Kinase aktiviert, welche wiederum eine MAP-Kinase aktiviert. MAPKKs besitzen einen regulatorischen N-Terminus und eine katalytische, C-terminale Serine/Threonine Protein Kinase. Nach Aktivierung durch Phosphorylierung, phosphoryliert die MAPKK konservierte Serin- oder Threoninreste an konservierten Positionen der MAPK. Die nun aktivierte MAPK phosphoryliert die Threonin- und Thyrosinreste eines konservierten Thr-X-Tyr Motivs in dem Aktivierungsloop der MAPK (Johnson *et al.*, 1996), wobei X für unterschiedliche Aminosäuren in den einzelnen MAPK steht. Die Phosphorylierung führt zu konformellen Änderungen in der MAPK, was zur Aktivierung der Kinasaktivität führt. MAP-Kinasen phosphorylieren ihre Substrate meist an Serin- und Threoninresten. Die Ziele von MAPK sind vielfältig und reichen von Transkriptionsfaktoren bis hin zu Transportern. Häufig translozieren MAPK nach Aktivierung auch in den Zellkern.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dient als Modelorganismus für die Erforschung von MAPK Signalwegen. In *Saccharomyces cerevisiae* gibt es fünf funktionell unterschiedliche MAP-Kinase Signaltransduktionswege: den Paarungspheromon-Antwortweg, den



**Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der drei MAPK-Signalwege der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

des Paarungspheromon-Antwortwegs, des filamentösen Wachstumswegs und des HOG-Signaltransduktionswegs. Für weitere Einzelheiten siehe Text.

Filamentösen-Wachstumsweg, den „High Osmolarity Glycerol Response“ (HOG)-Signaltransduktionsweg, den Zellwand-Integritäts (PKC) Weg und den Sporulation-MAP-Kinase (Smk1) Weg (Herskowitz, 1995; Gustin *et al.*, 1998). Diese Wege beschränken sich jedoch nicht nur auf die drei Kinasen; für eine korrekte Signalweiterleitung ist noch eine Vielzahl weiterer Komponenten nötig. So sind Gerüstproteine wie Ste5 und Pbs2 und Adaptorproteine wie Ste50 in der Signalweiterleitung involviert. Jeder Signalweg wird durch spezifische Reize ausgelöst und löst eine distinkte Zellantwort aus. Gleichzeitig stehen die Signalwege in einem gegenseitigen Crosstalk, d.h. die Signalwege beeinflussen und regulieren sich gegenseitig (Gustin *et al.*, 1998). Mehrere Komponenten sind an drei der erwähnten Signalwege, die in dieser Arbeit von Bedeutung sind, beteiligt und stehen in komplexen Wechselwirkungen zueinander (siehe Abbildung 1.1). Diese Verknüpfungen und Wechselwirkungen ermöglichen der Zelle um zu überleben sich mit begrenzten Werkzeugen an die unglaubliche Menge von unterschiedlichen Reizen, die in der natürlichen Umwelt herrschen, anzupassen. Ein wichtiger Faktor bei den komplexen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten, ist deren subzelluläre Lokalisierung, die sich dynamisch ändern kann. So kann die Zelle gewährleisten, dass die jeweiligen Interaktionspartner sich annähern und eine optimale Signalweiterleitung sicherstellen. Gerüst- und Adaptorproteine spielen gerade in diesem Zusammenspiel eine entscheidende Rolle, um die Wege losgelöst

voneinander zu aktivieren, aber auch unabhängig voneinander die Signalweiterleitung zu trennen. Deswegen ist es wichtig, die drei Signalwege - den Pheromon-Antwortweg, den filamentösen-Wachstumweg und den HOG-Signaltransduktionsweg - nicht nur getrennt, sondern auch im Zusammenspiel, genau zu untersuchen.

### 1.1.1 Der Pheromon-Antwortweg

*S. cerevisiae* existiert in zwei haploiden Paarungstypen -  $MATa$  und  $MAT\alpha$ . Wie die Gameten höherer Organismen können sich die  $MATa$  und  $MAT\alpha$  Zellen paaren, wobei durch eine zelluläre und eine nukleare Fusion eine diploide Zelle ( $MATa/MAT\alpha$ ) entsteht. Die Paarung ist das Ergebnis einer Reihe von komplexen Veränderungen in der Physiologie der Zelle, welche durch die Bindung von kleinen Peptiden, den Paarungspheromonen, ausgelöst werden.  $MATa$  Zellen produzieren den a-Faktor - ein C-terminal farnesyliertes, 12 Aminosäuren großes Peptid, das  $MAT\alpha$  Zellen aktiviert.  $MAT\alpha$  Zellen produzieren den  $\alpha$ -Faktor, der 13 Aminosäuren groß und unmodifiziert ist. Zellen reagieren auf den jeweiligen Faktor, indem sie in der G1-Phase des Zellzyklus arretieren und sich einer Formveränderung unterziehen (Shmoobildung). Durch diese Veränderungen nähern sich die Zellen einander an und bereiten sich auf die eigentliche Fusion vor. Die Partner sind in der Lage über Agglutinine zu aggregieren und bilden nach Zellfusion (Plasmogamie) und Kernfusion (Karyogamie) eine Zygote. Die hieraus entstehenden Zellen sind diploid ( $2n$ ) und können weiter vegetativ wachsen.

Der Pheromon-Antwortweg vom Pheromonrezeptor an der Zelloberfläche über ein trimeres G-Protein zu einer Mitogen-aktivierten-Protein-Kinase (MAPK) -Kaskade ist der am besten verstandene Signalweg der Eukaryonten.

Der  $\alpha$ -Faktor bindet an  $MATa$  Zellen an den Rezeptor Ste2, der aus sieben Transmembrandomänen (STMR) besteht (Jeness & Spatrick, 1986).  $MAT\alpha$  Zellen tragen den Rezeptor Ste3, der an den a-Faktor binden kann (Nakayama *et al.*, 1985). Beide Rezeptoren sind mit einem heterotrimeren G-Protein verbunden, welches aus den Untereinheiten Gpa1 ( $G_\alpha$ ), Ste4 ( $G_\beta$ ) und Ste18 ( $G_\gamma$ ) besteht, wobei hier Ste4 und Ste18 als  $G_{\beta\gamma}$  Komplex vorliegen. Der  $G_{\beta\gamma}$ -Komplex ist mittels einer hydrophobischen Prenylierung der  $G_\gamma$  Untereinheit an die Plasmamembran gebunden (Whitway & Thomas, 1994). Das Binden von Pheromon an den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) ermöglicht dem Rezeptor als Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) an dem gebundenen G-Protein zu fungieren. Dies ermöglicht den Verlust des gebundenen GDP und das anschließende Binden eines GTPs der  $G_\alpha$  Untereinheit. GTP verändert die Bindung von  $G_\alpha$  an den  $G_{\beta\gamma}$  Komplex und führt zu einer Dissoziation (Klein *et al.*, 2000).  $G_{\beta\gamma}$  ist dadurch in der Lage an seine Effektoren zu binden: Ste20, Ste5 und Far1 (Inoye *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 1998, Butty *et al.*, 1998; Leberer *et al.*, 1993; Ramer & Davis, 1993; Mukai *et al.*, 1993). Far1 bindet und aktiviert höchstwahrscheinlich Cdc24, den

GEF von Cdc42 (Nern *et al.*, 1999; Wiget *et al.*, 2004). Ste20 ist eine (PAK)<sub>p21</sub>-activated-kinase (Fanger *et al.*, 1997). Die Bindung beider Proteine wird durch die CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding Motif) Domäne vermittelt (Lamson *et al.*, 2002). Cdc42 befindet sich zum größten Teil an der Plasmamembran, da es C-terminal aufgrund einer CAAX-Box mit einer Geranylgeranylgruppe posttranslational modifiziert wird (Maltese & Sheridan, 1990; Finegold *et al.*, 1991; Yamane *et al.*, 1991). Ste5 stellt ein Gerüstprotein dar, welches die MAPKKK Ste11, die MAPKK Ste7 und die MAPK Fus3 in einem hochmolekularem Komplex zusammenhält (Choi *et al.*, 1994; Inoye *et al.*, 1997; Marcus *et al.*, 1994; Printen *et al.*, 1994). Da sowohl Cdc42 als auch G<sub>βγ</sub> an der Plasmamembran lokalisiert sind, und die Bindung von G<sub>βγ</sub> an drei Effektoren Far1, Ste5 und Ste20, welche an die unteren Komponenten der Kaskade binden, kommt es zu einer Annäherung und lokalen Konzentration aller Komponenten (Hirschmann *et al.*, 1994; Manahan *et al.*, 2000). Ste20 phosphoryliert, durch die Bindung an Cdc42 angeregt, Ste11. Dieser Schritt wird nicht von G<sub>βγ</sub> selbst reguliert (Lamson *et al.*, 2002). Dies löst die eigentliche MAPK-Kaskade aus und die Kinasen Ste7 (MAPKK) und FUS3 (MAPK) werden aktiviert (Wu *et al.*, 1995; Drogen *et al.*, 2000; Drees *et al.*, 2000; Lamson *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung von Ste11 erfolgt innerhalb einer aminoterminalen Region und ist deshalb essentiell für die Funktion von Ste11 (Drogen *et al.*, 2000). Durch die Phosphorylierung wird die Interaktion der inhibitorischen, aminoterminalen und regulatorischen Domäne mit der distalen, katalytischen Domäne von Ste11 aufgehoben und somit gleichfalls deren Autoinhibition (Drogen *et al.*, 2000). Hier kommt das Protein Ste50 zum Tragen, welches stark mit Ste11 interagiert und als Regulator von Ste11 fungiert, und eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der pheromoninduzierten Signaltransduktion spielt (Xu *et al.*, 1996, Jansen *et al.*, 2001). Die aktivierte MAPKKK Ste11 phosphoryliert die MAPKK Ste7, welche wiederum die MAPKs Fus3 und Kss1 durch Phosphorylierung aktiviert (Cairns *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1995; Gagono *et al.*, 2002). Die Aktivierung von Kss1 ist zwar abhängig von Ste11 und Ste7, benötigt aber nicht das Scaffold Protein Ste5 (Flatauer *et al.*, 2005; Maleri *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2004). Kss1 und Fus3 sind nah verwandt und Orthologe der Säuger MAP-Kinasen Erk1 und Erk2. Zellen ohne Fus3 und Kss1 sind steril; eine Einzeldelation von *KSS1* zeigt keine Veränderung in der Paarung, während eine *Δfus3* Mutante nur 10% der Paarungsaktivität des Wildtyps zeigt (Ma *et al.*, 1995; Elion *et al.*, 1991, Sabbagh *et al.*, 2001, Breitzkreuz *et al.*, 2003). Kss1 spielt in der Aktivierung des Filamentösen-Wachstumswegs eine hervorgehobene Rolle, wohingegen Fus3 als negativer Regulator des Filamentösen-Wachstumswegs dient, da es Tec1 phosphoryliert und damit dessen Degradation auslöst (Bao *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004; Bruckner *et al.*, 2004). Das Scaffold Protein Ste5 unterdrückt einen aktivierenden Crosstalk vom Pheromon-Antwortweg zum Filamentösen-Wachstumsweg, da Punktmutationen von Ste5 zu einer erhöhten Aktivierung von Kss1 und geringeren Fus3 abhängigen

Degradation von Tec1 führen (Qi & Elion 2005; Schwarz & Madhani, 2006). Durch Fusion von Ste5 mit Pbs2 können der HOG-Signalweg und der Pheromon Antwortweg zum Crosstalk gebracht werden (Park et al., 2003)

Als Transkriptionsfaktor am Ende der Pheromonantwort ist Ste12 zu nennen, das an PRE (Pheromone Responsive Elements) – Sequenzen bindet und dadurch die Transkription der nachgeschalteten, paarungsspezifischen Gene induziert (Yuan & Fields, 1991; Dolan et al., 1989; Kronstad et al., 1987). Ste12 wird unter anderem für die Regulation der Gene *FUS1* und *FAR1* benötigt. Das Protein Fus1 spielt während der Paarung eine wichtige Rolle und lokalisiert hierfür an die Spitze der Paarungsprojektion (Shmoo) (Truehaert & Fink, 1989). Far1 wird durch Fus3 phosphoryliert und fördert den Zellzyklusarrest in der G1 Phase, indem es G1-cyclinabhängige Kinasen inhibiert (O'Shea & Herskowitz, 2000). Far1 spielt überdies eine Rolle in der Etablierung von Stellen des polarisierten Wachstums. Es bindet hierbei, wie bereits beschrieben, über G<sub>βγ</sub> an die Plasmamembran und verbindet so als Gerüstprotein Cdc24 mit Cdc42 und Bem1 (Butty et al., 1998; Nern & Arkowitz, 2000; Richman et al., 2002). Dies führt zur Polarisierung des Aktinzytoskeletts an diesen Punkten (Chant, 1999).

Für die Zellen ist aber nicht allein die Signalweiterleitung wichtig, sondern auch die Anpassung an sich verändernde Bedingungen, die sogenannte Adaption. Im Falle der Pheromonantwort von *Saccharomyces cerevisiae* findet eine Desensibilisierung gegenüber dem Pheromonsignal statt. Zu den Adaptionenmechanismen gehört die Hydrolyse des Nukleotids von GTP-G<sub>α</sub>, welche durch das GTPase-aktivierenden-Protein (GAP) Sst2 beschleunigt wird, sowie die Dephosphorylierung von Fus3 durch Msg5 (Dohlmann & Thorner, 2001; Blackwell et al., 2007). Ein zusätzlicher Mechanismus ist die Feedbackregulation, die zur Phosphorylierung und anschließender Internalisierung und Degradation der Oberflächenrezeptoren (Ste2 und Ste3) führt (Hicke & Riezmann, 1996; Hicke et al., 1998; Roth et al., 1998; Wang & Dohlmann, 2002; Wang & Elion 2003; Esch & Errede 2002).

### 1.1.2 Der filamentöse-Wachstumsweg

In einer Umgebung, die ausreichend Nährstoffe enthält, wachsen *Saccharomyces cerevisiae* Zellen durch Knospung. Die Knospen entstehen bei haploiden Zellen (1n) immer am selben Zellpol, wo auch die eigene Knospennarbe liegt. Die Knospen liegen nicht aufeinander sondern eng beieinander (axiale Knospung). In diploiden Zellen (2n) entstehen die Knospen entweder am gleichen, oder am gegenüberliegenden Ende der Zellen (bipolares Knospen). Nimmt nun der Nährstoffgehalt des Mediums ab und wird limitierend für das Wachstum, gibt es in der Zelle morphologische Veränderungen. Die diploide Zelle elongiert und es bilden sich nur noch Knospen am gegenüberliegenden

Ende der eigenen Knospungsnarbe (unipolar) und sogenannte Pseudohyphen (Gimeno *et al.*, 1992). Pseudohyphen sind durch Zellwände in einzelne Zellen geteilt, und gleichen nur in der Form den echten Hyphen. Die Zellen weisen dann eine verstärkte Zell-Zell Adhäsion und Zell-Substrat Adhäsion auf. In haploiden Zellen gibt es ein verwandtes Phänomen, das als invasives Wachstum bezeichnet wird (Roberts & Fink, 1994). Ersteres wird durch Stickstoffmangel ausgelöst, während letzteres durch einen Mangel von Glukose im Medium hervorgebracht wird (Gimeno *et al.*, 1992; Kron *et al.*, 1994; Roberts & Fink 1994). Aber auch Stickstoffmangel kann Adhäsion in haploiden Zellen auslösen (Braus *et al.*, 2003) Es wurde weiterhin beobachtet, dass filamentöses Wachstum durch sekundäre Alkohole (Fuselalkohol) und aromatische Alkohole ausgelöst werden kann (Dickson, 1996; Lorenz *et al.*, 2000; Chen & Fink, 2006). Diese kleinen Moleküle können in die Plasmamembran eindringen, und dadurch möglicherweise Rezeptoren oder Transporter beeinflussen. Da sie auch sekundäre Metabolite sind, könnte es sich um einen Mechanismus des Quorum-Sensing handeln, der auf das filamentöse Wachstum Einfluss nimmt (Chen & Fink, 2006).

Der pseudohyphale Dimorphismus diploider Zellen und das verwandte invasive Wachstum haploider Zellen werden durch ein komplexes regulatorisches Signalnetzwerk gesteuert. (Madhani & Fink, 1997; Rupp *et al.*, 1999; Gagiano *et al.*, 2002; Vyas *et al.*, 2003; Schwartz & Madhani, 2006). Die Zentren dieses Netzwerks bilden zwei Signalwege - der filamentöse-MAPK-Signalweg und der Ras/cAMP Signalweg.

Es konnten Transmembranproteine identifiziert werden, die in haploiden, diploiden oder auch beiden Zelltypen für filamentöses Wachstum benötigt werden: Sho1, Msb2, Mep2 und Gpr1 (Cullen *et al.*, 2004; Lorenz & Heitman, 1998; Van Nuland *et al.*, 2006; Tamaki *et al.*, 2000; Lorenz *et al.*, 2000). Sho1 kann heterooligomere Komplexe mit Msb2 bilden; bei Verlust eines dieser Proteine kann der MAPK-Signalweg nicht mehr aktiviert werden. Msb2 besitzt eine große, hoch glykolisierte extrazelluläre Domäne. Deletionen innerhalb dieser Domäne führen zu einer konstitutiven Aktivierung des filamentösen Wachstumswegs in haploiden Zellen (Cullen *et al.*, 2004).

Mep2 ist eine hochaffine Ammoniumpermease, die als Stickstoffsensor dient und in diploiden Zellen für filamentöses Wachstum benötigt wird. (Lorenz & Heitman 1998; Gagiano *et al.*, 1999; Lemaire *et al.*, 2004). Die niederaffinen Permeasen Mep1 und Mep3 haben keinen Einfluss auf das pseudohyphale Wachstum (Lorenz & Heitman; 1998). Hyperaktive Ras2 Mutanten, so die Ras2<sup>Val19</sup> Mutante, können eine *MEP2* Deletion in diploiden Zellen komplementieren. Aufgrund dessen wird Mep2 oberhalb von Ras2 in der Aktivierung des MAPK und des Proteinkinase A (PKA, cAMP abhängige Proteinkinase) Signalwegs angesiedelt (Van Nuland *et al.*, 2006).

Die Ziel MAP-Kinase Kss1, welche auch in der Pheromonantwort eine Rolle spielt, wird durch eine Phosphorylierungskaskade von der PAK Ste20 über die MAPKKK Ste11 und

die MAPKK Ste7 aktiviert (Liu *et al.*, 1993; Tatebayashi *et al.*, 2006; Flatauer *et al.*, 2005). Der Ste11 Regulator Ste50 spielt auch eine Rolle im filamentösen Wachstumsweg. Ste20 wird durch Cdc42-GTP aktiviert. Cdc42 wiederum scheint abhängig von Ras2 aktiviert zu werden (Mösch *et al.*, 1996; Mösch *et al.*, 1999). Cdc42 aktiviert dann in seiner aktivierten Form Effektoren wie Ste20 (Leberer *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1996). Wie jeweils Ras2 und Cdc42 aktiviert werden, und welche Rolle ihre GEFs Cdc25 und Cdc24 im Detail spielen muss noch genauer untersucht werden.

Phosphoryliertes Kss1 aktiviert den Transkriptionsfaktor Ste12, der an der Bildung von Pseudohyphen beteiligt ist. Ste12 bindet jedoch die DNA nicht allein, sondern als Heterodimer zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Tec1 (Gavrias *et al.*, 1996; Madhani & Fink, 1997). Tec1 kann allerdings auch alleine als Transkriptionsfaktor fungieren (Kohler *et al.*, 2002). Der Ste12 - Tec1 Komplex bindet an DNA Sequenzen, die aus einer PRE (pheromone response element) für Ste12 und einer TCS (Tec1 binding site) bestehen, sie werden als filamentation response element (FRE) bezeichnet (Zeitlinger *et al.*, 2003; Madhani *et al.*, 1997). Mittels der FREs wird die Regulation von Zielgenen wie *TEC1*, dem Retrotransposon Ty1 oder dem Flocculin *FLO11* geleitet (Cook *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998; Lo & Dranginis, 1998). Die Regulation von *FLO11* wurde ausführlich untersucht, da *FLO11* einen der längsten Promotoren im Hefegenom hat (Lo *et al.*, 1997). Es spielen viele Faktoren neben Ste12-Tec1 eine Rolle, so Flo8 (vom PKA Weg induziert), Msn1, Sfl1 und Mss11 (Rupp *et al.*, 1999; Gagiano *et al.*, 1999; Fichtner *et al.*, 2007)

Der Regulator Flo8 wird unabhängig vom MAPK Signalweg reguliert. Die Aktivierung läuft über den Ras/cAMP Signalweg. Dieser wird von GPCR Gpr1 oder Ras2 aktiviert, welcher als Kohlenstoffsensoren agiert und mit der  $G_{\alpha\beta\gamma}$  Untereinheit Gpa2 ( $G_{\alpha}$ ) interagiert (Lemaire *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 1998; Lorenz *et al.*, 2000). Gpr1 zeigt eine hohe Affinität zu Sukrose und Glukose (Kraakman *et al.*, 1999; Lemaire *et al.*, 2004). Interessanterweise wird das Gen *GPR1* unter Stickstoffmangel verstärkt transkribiert. Gpr1 und Gpa2 sind oberhalb vom PKA Weg angesiedelt und spielen eine wichtige Rolle in dessen Steuerung. Es wird postuliert, dass Gpa2 Ras2 aktiviert, welches als Aktivator der Adenylatzyklase Cyr1 bekannt ist. Es könnte jedoch auch sein, dass Gpa2 die PKA unabhängig von Ras2 oder der Adenylatzyklase aktivieren kann (Xue *et al.*, 1998). Die Adenylatzyklase bindet Ras2 mittels einer Ras-Associating (RA-) Domäne. Aktivierte Cyr1 verwandelt ATP in cAMP. Das erhöhte cAMP Level führt zu einer Aktivierung der PKA. Die PKA besteht unter anderem aus drei katalytischen Untereinheiten - Tpk1-3 und der regulatorischen Untereinheit Bcy1, welche nach Binden von cAMP von den anderen Untereinheiten dissoziiert und dadurch die katalytischen Untereinheiten aktiviert. Der Transkriptionsfaktor Flo8 wird durch die Tpk Proteine phosphoryliert und somit aktiviert.

Am Ende des cAMP-Signalwegs und der MAPK-Signalkaskade stehen also eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Zielgenen steuern, welche zum Wechsel von Hefe- zur Pseudohyphenform benötigt werden.

### 1.1.3 Der Hochosmolare Antwortweg

Ein Anstieg der Konzentration von gelösten Stoffen im extrazellulären Medium zu einem Level, das das intrazelluläre übersteigt, führt zu einem Abfall des Turgordrucks und einem Ausströmen von Wasser aus der Zelle. Dies ist schädlich für die Zelle, und muss mittels eines adäquaten Mechanismus aufgefangen werden. *Saccharomyces cerevisiae* synthetisiert als Osmolyt Glyzerin, um damit den Turgor aufrecht zu erhalten (Blomberg & Adler, 1992). Dieser Mechanismus wird als High-Osmolarity-Glycerol (HOG) Antwort bezeichnet. Das Überleben unter hochosmolaren Bedingungen wird mittels des HOG MAPK-Signalwegs gesichert, dessen zentrale MAP-Kinase das namensgebende Hog1 ist, ebenfalls ein funktionelles Ortholog der Säugerzellen p38 Familie der Stress-Aktivierten-MAPKs.

Im HOG-Antwortweg gibt es zwei, voneinander getrennt funktionierende Wege, die zu einer Aktivierung von Hog1 führen. Der erste Weg beinhaltet ein Histidin-Aspartat Phosphoübertragungsmodul, welches Ähnlichkeiten zu den prokaryontischen Zwei-Komponenten-Systemen zeigt. Der Osmosensor Sln1 ist ein Transmembranprotein, das drei Domänen besitzt: eine N-terminale Sensordomäne und C-terminal, eine Histidinkinase sowie eine Receiverdomäne mit einem konservierten Aspartatrest (Ota & Varshvsky, 1993). Unter isoosmotischen Bedingungen ist Sln1 aktiv und katalysiert die Autophosphorylierung auf einem Histidinrest und vermittelt anschließend einen Phosphotransfer zu einem Aspartatrest der Receiverdomäne von Sln1. Von da wird der Phosphatrest von Sln1 auf einen Histidinrest auf dem Transferprotein Ypd1 transferiert, welches die Phosphatgruppe an einen konservierten Aspartatrest von Ssk1 transferiert (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996). Phosphoryliertes Ssk1 kann nicht mit den beiden MAPKKs Ssk2 und Ssk22 interagieren. Leichter Osmostress inhibiert Sln1, wodurch sich unphosphoryliertes Ssk1 ansammelt, welches dann mittels der Receiverdomäne an die inhibitorische Domäne von Ssk2 und Ssk22 binden kann, und somit deren Autophosphorylierung einleitet (Posas & Saito, 1998). Diese MAPKKs aktivieren wiederum Pbs2, die MAPKK, welche für die Phosphorylierung und Aktivierung von Hog1 verantwortlich ist (Maeda *et al.*, 1995; O'Rourke & Herskowitz, 2002).

Der zweite Weg über den Hog1 aktiviert werden kann, läuft über die MAPKK Ste11, welche auch in der Pheromonantwort und dem filamentösen Wachstumsweg eine Rolle spielt. Ste11 interagiert in diesem Weg mit der MAPKK Pbs2. Oberhalb von Ste11

befindet sich das Cdc42-Ste20 Modul, welches die Aktivierung von Ste11 mittels einer Phosphorylierung auslöst. (Raitt *et al.*, 2000). Oberhalb von Cdc42 sind derzeit drei Elemente identifiziert worden. Das mucinähnliche Protein Msb2, das Transmembranprotein Sho1 und ein weiteres mucinähnliches Protein Hkr1 (O'Rourke & Herskowitz, 2002; Tatebayashi *et al.*, 2007). Bisher wurde Sho1 als Osmosensor bezeichnet, doch neuere Ergebnisse zeigen, dass dies nicht der Fall ist (Tatebayashi *et al.*, 2007). Es ist wahrscheinlicher, dass Hkr1 und Msb2 zusammen als Osmosensor dienen. Sho1 wird unterhalb von beiden angesiedelt und hat eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der Signalkomponenten. Der C-terminale, cytosolische Schwanz von Sho1 bindet Ste11 und zusätzlich, über eine SH3 Domäne, Pbs2 (Pawson & Gish, 1992; Maeda *et al.*, 1995; Zarrinpar *et al.*, 2004). Ste11 bindet fest an das Adaptorprotein Ste50, welches mit dem Transmembranprotein Opy2 und möglicherweise mit Sho1 interagiert (Posas & Saito, 1997; Posas *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001; Tatebayashi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). So funktionieren Sho1 und Pbs2 zusammen als Gerüstproteine für den HOG-Signalweg (Zarrinpar *et al.*, 2004). Pbs2 bindet die MAPK Hog1 durch ein spezielles Bindemotif, welches distal zu den aktiven Domänen liegt (Posas & Saito 1997; Chang *et al.*, 2002; Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Aktiviertes Hog1 transloziert vom Cytosol in den Zellkern (Ferringo *et al.*, 1998; Westfall & Thorner 2006). Dort bindet und phosphoryliert Hog1 Transkriptionsfaktoren wie Sko1, Msn1, Msn2, Msn4 sowie Hot1. Msn2 und Msn4 sind Aktivatoren und binden an STRE Sequenzen (stress responsible elements) in Promotoren von verschiedenen Zielgenen. Sko1 hingegen ist ein Repressor/Aktivator und bindet an CRE-Sequenzen (cAMP-Response-Element). Sko1 wird mittels Phosphorylierung durch Hog1 von einem Repressor zu einem Aktivator (Proft *et al.*, 2001; Proft & Struhl 2002, Guha *et al.*, 2007). So kontrolliert Sko1 über die CRE Sequenzen Gene wie *NHA1*, *ENA1* und *GRE2* (Proft & Serrano, 1999; Pascual-Adhair *et al.*, 2001). Aktiviertes Hog1 beeinflusst die Transkription von hunderten von Genen - die wichtigsten die aktiviert werden sind *GPD1* und *HOR2/GPP2*, die beide für die Glycerolsynthese in der Zelle benötigt werden (de Nadal *et al.*, 2002; Norbeck *et al.*, 1996; Hirayama *et al.*, 1995). Aktiviertes Hog1 scheint auch Ziele außerhalb des Zellkerns zu haben, so den Natrium-Proton-Antiport Nha1 (Proft & Struhl 2004). Dieser wird von Hog1 signalspezifisch phosphoryliert und somit aktiviert. Dieser Mechanismus ermöglicht den Zellen innerhalb von Sekunden eine Möglichkeit, den Turgordruck in der Zelle wieder herzustellen (Proft & Struhl 2004). Ob dies vor der Kernlokalisierung erfolgt, oder ob es sich um ein anderes Subset von aktivem Hog1 handelt, ist noch nicht geklärt worden.

Nachdem die Zelle die Antwort auf hyperosmolaren Stress eingeleitet und sich an die Umgebung adaptiert hat, wird die Signalweiterleitung abgeschaltet. Ein Mechanismus der Adaption läuft ebenfalls über Hog1. So phosphoryliert Hog1 in einem

Feedbackmechanismus das Transmembranprotein Sho1 (Hao *et al.*, 2007). Wird Sho1 auf diese Weise phosphoryliert, so zerfallen die Sho1 Homooligomere, was zu einer Abschwächung der Aktivierung von Hog1 führt (Hao *et al.*, 2007). Hog1 wird von der Phosphatase Ptp2 im Zellkern dephosphoryliert und aus dem Zellkern transportiert (Ferrigno *et al.*, 1998). Auch im Zytosol sind weitere Phosphatasen (Ptp3, Ptc1-3) aktiv, die zu einer Inaktivierung von Hog1 führen (Warmka *et al.*, 2001; Wurgler-Murphy *et al.*, 1997; Jacobi *et al.*, 1997)

## **1.2 Das regulatorische Adaptorprotein Ste50**

### **1.2.1 Struktur und Funktion des Proteins Ste50**

Den drei ausführlich beschriebenen MAPK-Signalwegen sind mehrere Komponenten gemeinsam. So spielen die Proteine Ste50, Ste11, Ste20 und Cdc42 in dem Pheromon-Antwortweg, dem Filamentösen-Wachstumsweg und dem HOG-Signalweg eine Rolle. Diese Komponenten stehen in Wechselwirkungen zueinander, um den zentralen Schritt der Aktivierung der MAPKKK Ste11 durch die PAK Ste20 zu gewährleisten. Die PAK Ste20 kann in allen drei Signalwegen oberhalb von Ste11 angesiedelt werden (Wu *et al.*, 1995; Pryciak & Huntress 1998; O'Rourke & Herskowitz 1998; Ramezani-Rad *et al.*, 1998). Ste20 gehört zu der Familie der p21 activated kinase (PAK) der Proteinkinasen. Im Falle von Ste20 ist p21 das kleine monomerische Ras-ähnliche G-Protein Cdc42. Ste20 wird durch Cdc42 aktiviert, indem Ste20 über die CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) Domäne an aktiviertes GTP-Cdc42 bindet (Leberer *et al.*, 1997). Die CRIB Domäne überlappt mit einer N-terminalen autoinhibitorischen Domäne. Durch die Bindung an Cdc42 wird diese Inhibierung aufgehoben und die Kinaseaktivität von Ste20 aktiviert. Ste20 kann dann Ste11 phosphorylieren und so aktivieren (Drogen *et al.*, 2000; Lamson *et al.*, 2002). Cdc42 ist mittels einer Geranylgeranyl-Modifizierung an der C-terminalen CAAX-Box an Membran rekrutiert, lokalisiert an Stellen des polaren Wachstums und ist für die korrekte Lokalisation von Ste20 während der Signalweiterleitung verantwortlich (Leberer *et al.*, 1997). Eine Interaktion von Ste20 und Cdc42 konnte während der Paarung, dem filamentösen Wachstum und dem Osmostress nachgewiesen werden (Peter *et al.*, 1996; Johnson, 1999; Raitt *et al.*, 2000). Das Substrat von Ste20, die MAPKKK Ste11, muss in die Nähe des Ste20-Cdc42 Komplexes lokalisiert werden. Hier spielt das regulatorische Adaptorprotein Ste50 eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Ste50 sowohl stark mit Ste11, als auch, dass Ste50 mit Cdc42 interagiert (Spode, 2003; Truckses *et al.*, 2006). Ste50 fungiert somit als Adaptor zwischen Ste11 und dem Cdc42-Ste20 Komplex um eine maximale Aktivierung des Signalwegs zu ermöglichen.

Ste50 wurde zuerst im MAPK-Signalmodul der Paarung entdeckt. Es wurde mittels quantitativer Paarungsanalysen von Deletionsmutanten im Rahmen eines *Saccharomyces cerevisiae* Genomanalyseprojektes identifiziert - daher der Name Ste50 (steril) (Ramezani-Rad *et al.*, 1992). Das Protein Ste50 ist 346 Aminosäuren groß. Es wird zellzyklusunabhängig und unabhängig vom Paarungstyp transkribiert. Neben der Pheromon-Antwort ist Ste50 auch für den HOG-Signalweg und den filamentösen Wachstumsweg essentiell. Ste50 besitzt drei distinkte Bereiche. So ist am N-terminalen Ende von AS 27-108 eine SAM (Steril alpha motif) Domäne (Ponting *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996). Am C-terminalen Ende enthält Ste50 ein sogenannte Ras-associated (RA)-Domäne (Ponting & Benjamin, 1996). Der mittlere Bereich des Proteins ist eine Serin/Threonin reiche Region. Beide Domänen von Ste50 - die SAM Domäne und die RA Domäne - können zusammen als eine regulatorische Einheit angesehen werden. Erst das Zusammenspiel beider Domänen und der S/T reichen Reigion ermöglicht die volle Funktion von Ste50 als regulatorischer Adaptor.

Die Inaktivierung von Ste50 führt zur Abschwächung des paarungssphermon-spezifischen Signals in haploiden Zellen. Die Menge an Ste50 in der Zelle scheint einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung des Zell-Zyklus-Arrests zu haben. Eine Überexpression von Ste50 erhöht die Dauer des G1 Arrests und verstärkt die ausgelösten morphologischen Veränderungen und die *FUS1-lacZ* Expression (Ramezani-Rad *et al.*, 1992; Xu 1993). Peptide die an Ste50 binden führen zu einer erhöhten Pheromonresistenz, und bestätigen dadurch die Rolle von Ste50 in der Pheromonantwort (Norman *et al.*, 1999). Eine Überexpression von Ste11 oder einer konstitutiv aktiven Mutante von Ste11, kann die Attenuierung einer *STE50* Deletion teilweise komplementieren (Ramezani-Rad *et al.*, 1998). Wird Ste11 hingegen zur Plasmamembran rekrutiert, so wird der Pheromonantwortweg, abhängig von Ste5, verstärkt eingeleitet, wobei eine Deletion von *STE50* überbrückt werden kann (Wu *et al.*, 2006). Ste50 kann daher im Pheromonsignalweg oberhalb von Ste11 und unterhalb der G-Proteine angesiedelt werden.

Ste50 kontrolliert auch den Signaltransduktionsweg des haploiden invasiven Wachstums und reguliert die Bildung von diploiden Pseudohyphen. Deletionsmutanten von *STE50* sind nicht mehr in der Lage invasiv zu wachsen, oder den *FG(TyA)-lacZ* Reporter zu aktivieren. Dieser Effekt kann durch die Überexpression von Ste11 oder hyperaktivem Ste11 komplementiert werden (Truckses *et al.*, 2006). Ste50 zeigt eine Interaktion mit dem kleinen G-Protein Ras2 sowohl in vivo, als auch in vitro (Hopp, 2005). Ste50 ist daher oberhalb von Ste50 und unterhalb von Ras2 anzusiedeln (Ramezani-Rad *et al.*, 1998; Rupp *et al.*, 1998).

In dem Sho1 Weg der *HOG1*-Signalkaskade der Osmoregulation stellt Ste50 ebenso eine essentielle Komponente dar. Ist der Sln1 Weg inaktiviert, so führt die zusätzliche Deletion von *STE50* zum Verlust der Lebensfähigkeit unter hochosmolaren Bedingungen (Posas & Saito 1997). So kann nur konstitutiv aktives Ste11, und nicht wildtypisches Ste11 den  $\Delta ste50$  Phänotypen supprimieren (Posas *et al.*, 1998). Ste50 interagiert in diesem Weg mit dem Transmembranprotein Opy2, welches als Komponente der Signalkaskade identifiziert wurde, und dem Protein Sho1 (Tatebayashi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Nur im HOG-Signalweg ist zu beobachten, dass wenn der N-terminale Teil (AS 1-252) und der C-terminale Teil von Ste50 (AS 215-346) in der Zelle co-exprimiert werden, die Zellen wieder unter hyperosmolaren Bedingungen wachsen können. Allerdings ist dieses Wachstum schwächer als bei Plasmid exprimierten WT-Ste50 (Spode, 2003).

Die Ste50 Funktion steht im Crosstalk mit dem Ras/cAMP Signalweg. So zeigt *STE50* eine genetische Interaktion mit *PDE2* unter Osmostress und in der Langlebigkeit der Zellen (Poplinski *et al.*, 2007). Dies deutet darauf hin, dass Ste50 als Verknüpfungspunkt zwischen der MAPK-Signalkaskade und dem Ras/cAMP Signalweg dienen könnte.

Ste50 wird auch signalspezifisch phosphoryliert (Spode, 2003; Wu *et al.*, 2003; Hopp, 2005; Hao *et al.*, 2008). Ste50 ist konserviert innerhalb der Pilze. Das Ortholog in *Magnaporthe grisea* Mst50 ist ein Regulator des Ste11 Orthologs Mst11. Es konnte gezeigt werden, dass mst50 mit Ras1, Ras2 und Cdc42 interagiert (Park *et al.*, 2006)

### 1.2.2 Die Struktur und Funktion der SAM-Domäne von Ste50

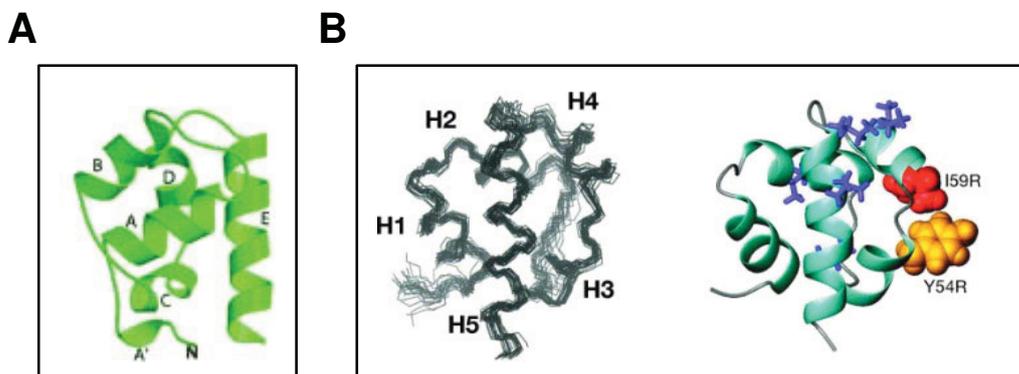
Das Protein Ste50 reguliert die MAPKKK Ste11 in der Signaltransduktion. Diese Regulation erfolgt über eine direkte Interaktion der beiden Proteine, die über eine kurze aminoterminal Domäne vermittelt wird. Diese Domäne wird als SAM-Domäne bezeichnet (Ponting 1995). SAM Domänen bestehen aus  $\sim 70$  Aminosäuren in über 300 Proteinen und vermitteln Protein-Protein Interaktionen in diversen Funktionen wie Signaltransduktion und transkriptionale Repression (Ponting, 1995; Barr *et al.*, 1996). Ausführliche strukturelle Analysen einer Reihe von SAM-Domänen haben gezeigt, dass diese sowohl Homo- als auch Heterooligomere bilden können (Kyba & Brock 1998). Die heterotypische Interaktion von Ste50 konnte sowohl mittels des Two-Hybrid-Systems als auch biochemisch nachgewiesen werden (Ramezani-Rad *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001). Die Interaktion ist unabhängig von der Signaltransduktion in der Paarung und vom HOG-Signalweg (Ramezani-Rad *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1998). Es konnte zudem gezeigt werden, dass ein Verlust der aminoterminalen regulatorischen Domäne von Ste11 ( $\Delta N$ -Ste11) konstitutiv aktiv im Pheromonweg ist und so zu einem G1-Arrest führt (Wu *et al.*, 1999; Posas & Saito, 1997). Es konnte nachgewiesen

werden, dass die regulatorische Funktion von Ste50 auf die Aktivierung von Ste11 in den drei Signalwegen unterschiedlich erfolgt (Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001)

Eine Deletion der SAM Domänen von Ste11 oder Ste50 führt zu einem Defekt im Paarungsweg. Hingegen kann eine Überexpression von Ste11 $\Delta$ SAM die Signalweiterleitung in der Pheromonantwort wiederherstellen, obwohl es nicht mit Ste50 interagiert (Jansen *et al.*, 2001). Dies zeigt, dass die Interaktion von Ste11 mit Ste50 für eine korrekte Signalweiterleitung wichtig ist und dass Ste50 nicht direkt an der eigentlichen Signalkaskade beteiligt ist. Ähnliches zeigt sich im filamentösen Wachstumsweg, wo Ste11 $\Delta$ SAM unter Überexpression das Signal wiederherstellen kann. Im HOG-Signalweg hingegen sind die SAM Domänen essentiell (Jansen *et al.*, 2001).

Mutanten von der SAM Domäne von Ste50, die verstärkt homodimerisieren, aber schwächer mit Ste11 interagieren, zeigen eine verstärkte Paarungsantwort sowie invasives Wachstum, jedoch ein reduziertes Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen (Jansen *et al.*, 2001). So dient Ste50 mittels der SAM Domäne als Modulator von Ste11. Die eigentliche Wirkungsweise - wie Ste50 die Signalweiterleitung verstärkt und die Interaktion der SAM Domänen das Signal moduliert - ist noch nicht ganz klar. Es gibt jedoch deutliche Unterschiede in der Modulierung der einzelnen Signalwege durch Ste50.

Die SAM Domäne von Ste50 erstreckt sich über die Aminosäuren 27-108. Die SAM-Domäne von Ste11 ist im Bereich des N-Terminus von Aminosäure 1-96. Durch ausführliche genetische und biochemische Analysen konnte gezeigt werden, dass es diese beiden SAM Domänen sind, die die Interaktion der beiden Proteine vermitteln. Die Struktur der jeweiligen SAM-Domäne sowie die Struktur des Oligomers aus beiden Domänen wurde aufgeklärt (Grimshaw *et al.*, 2004; Kwan *et al.*, 2004; Battacharjya *et*



**Abbildung 1.2 SAM-Domänen von Ste50 und Ste11**

Dargestellt ist die Kristallstruktur der SAM-Domäne von Ste50 (**A**, nach Grimshaw *et al.*, 2004) sowie Ste11 (**B**, nach Kwan *et al.*, 2004).

*al.*, 2004). Mittels NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass Ste50-SAM als Monomer existiert. Es besteht aus 6 Helices, die eine kompakte globale Faltung aufweisen. Die Helices setzen sich zusammen aus der Helix A' (23-34), den zwei kurzen  $\alpha$ -Helices Helix A (37-46) und Helix B (55-62), der Helix C (67-72), der Helix D (75-81) sowie der langen C-terminalen Helix E (86-101) (Grimshaw *et al.*, 2004; Abbildung. 1.2 A). Die SAM-Domäne von Ste11 besteht aus den fünf Helices H1 (24-30), H2 (36-44), H3 (49-54), H4 (57-63) sowie H5 (68-80) (Kwan *et al.*, 2004; Abbildung 1.2 B). SAM Domänen bilden meist Homodimere, doch konnte für die SAM Domäne von Ste50 gezeigt werden, dass diese als Monomer vorliegt, was die biochemischen Analysen bestätigt (Jansen *et al.*, 2001). Die SAM Domäne von Ste11 liegt *in vitro* hingegen nur in geringer Konzentration als Monomer vor, in höheren Konzentrationen bildet sie Dimere und höhere Oligomere (Kwan *et al.*, 2004; Bhattacharjya *et al.* 2004). Kwan *et al.* favorisieren einen Heterotrimer, der aus zwei Ste11 SAM Domänen und einer Ste50 SAM Domäne besteht. Diese Hypothese konnte *in vivo* mittels Fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) bestätigt werden (Slaughter *et al.*, 2008). Hierbei zeigte sich, dass dieser Komplex immer und somit unabhängig von der Signalweiterleitung in der Zelle vorliegt. Überschüssiges Ste50 bildet Homooligomere (Slaughter *et al.*, 2008). Dies weicht von den *in vitro* Beobachtungen ab, wo nur Ste11-SAM Domänen Homooligomere bilden. Mutanten der SAM-Domäne von Ste50 unterdrücken nicht nur die Bildung des Heterotrimers, sondern auch die Dimerisierung von Ste11-SAM (Slaughter *et al.*, 2008). Diese Art der Bindung scheint speziell für *Saccharomyces cerevisiae* zu sein, denn die Homologe in *Schizosaccharomyces pombe* Ste4 (Ste50) und Byr2 (Ste11) zeigen ein anderes Interaktionsverhalten (Barr *et al.*, 1996). Die SAM Domänen dieser Proteine scheinen eine Heterodimer zu bilden (Ramachander & Bowie, 2004).

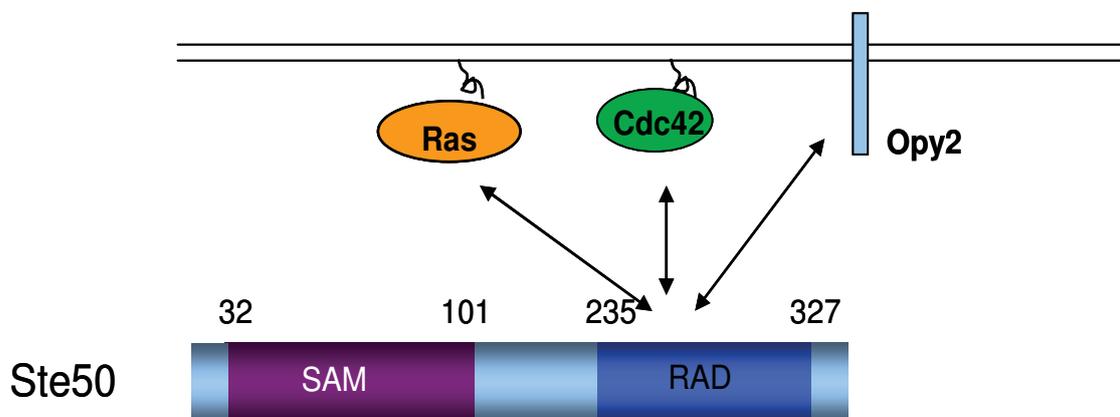
### 1.2.3 Die Serin/Threonin reiche Region von Ste50

Der mittlere Teil von Ste50 spielt möglicherweise in der Regulation des Proteins eine Rolle. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Ste50 signalabhängig phosphoryliert wird (Wu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003; Spode, 2003; Hopp, 2005). Ste50 stellt daher ein Phosphoprotein dar, welches an zahlreichen Serin/Threoninresten *in vivo* phosphoryliert wird. So ist die Phosphorylierung des Threonin T42 für eine effiziente Signalweiterleitung während der Pheromonantwort wichtig (Wu *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung dieses Threoninrests erfolgt in Abhängigkeit von der Kaseinkinase Yck1 (Wu *et al.*, 2003). Eine weitere Phosphorylierungsmutante zeigt einen Defekt im Hochosmolarem Antwortweg (Spode, 2003). Die Phosphorylierung von Ste50 ist abhängig von der Kinaseaktivität von Ste11 (Hopp, 2005). Doch dieser Bereich von Ste50 scheint nicht nur für Phosphorylierungen gebraucht zu werden. Die Ste50 Mutante D146F kann, wenn sie zusammen mit einer hyperaktiven Ste11 Mutante exprimiert wird,

den HOG-Signalweg spontan, ohne hochosmolaren Stress, einleiten. Dies wird vermutlich durch die verstärkte Interaktion mit Sho1 ausgelöst (Tatebayashi *et al.*, 2006).

#### 1.2.4 Die Struktur und Funktion der RA-Domäne von Ste50

Für seine Funktion in den Signalwegen der Pheromonantwort, dem invasiven Wachstum und der Osmotoleranz benötigt Ste50 nicht nur die SAM Domäne, welche die Interaktion mit Ste11 vermittelt, sondern auch die RA Domäne, welche sich am C-terminalen Ende befindet (Ramezani-Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). RA Domänen (Ras associated) vermitteln die Interaktion mit den kleinen G-Proteinen wie Ras und Raf (Herrmann *et al.*, 1996; Linnemann *et al.*, 1999). Sie wurde anhand von Sequenzhomologien von RalGDS und anderen Proteinen postuliert (Ponting & Benjamin, 1996). Viele Proteine mit dieser Domäne waren bisher nicht als Ras Interaktionspartner bekannt - so AF6, das Drosophila Homolog Myr-5, die DAG-Kinase, Ste50 und dessen Homolog in *S. pombe* Ste4. Eine verwandte Gruppe von Domänen, die RBD (Ras Binding Domain), zeigen nur sehr geringe Ähnlichkeit in der Sequenz. Es gibt jedoch Hinweise, dass beide Domänen eine sehr ähnliche drei-dimensionale Faltung aufweisen (Wohlgemuth *et al.*, 2005; Kiel *et al.*, 2005). Die Erkennung von RA-Domänen wird dadurch erschwert, dass die RA-Domäne tragenden Proteine auch mit anderen kleinen G-Proteinen der Ras-Subfamilie interagieren können, so z.B. mit dem kleinen G-Protein Rap. So bindet die RA-Domäne von RalGDS mit einer hohen Affinität an Rap-Proteine, wohingegen die RBD von Raf1 eine höhere Bindeaffinität gegenüber Ras als Rap aufweist (Wittinghofer & Nasser, 1996). Die meisten RAD/RBD binden an die switch I Region von Ras, und obwohl sie ähnliche Faltungen aufweisen, so sind doch andere Reste an der



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Ste50 RA-Domäne Interaktionen.** Das Protein Ste50 interagiert mit den Ras Proteinen Ras1 und Ras2, dem Rho-ähnlichen Protein Cdc42 und dem Transmembranprotein Opy2. Für weitere Einzelheiten siehe Text.

Bindung beteiligt (Geyer et al., 1996; Huang et al., 1997; Esser et al., 1998; Vetter et al., 1999; Pacold et al., 2000). RA Domänen sind um die einhundert Aminosäuren groß, was auch für die RA Domäne von Ste50 zutrifft (AS 235-327). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gibt es ein weiteres Protein mit einer RA-Domäne, die Adenylatzyklase Cyr1. Die Adenylatzyklase ist mit 2026 Aminosäuren deutlich größer als Ste50. Die RA-Domäne liegt bei Cyr1 mitten im Protein des als LRR (leucin rich region) bezeichneten Bereichs (AS 676-765). Für die RA-Domäne von Cyr1 wurde eine Interaktion mit Ras2 gezeigt (Kuroda et al., 1993; Kido et al., 2002). Die Adenylatzyklase zeigt zwei unterschiedliche Interaktionen mit Ras2, die beide für eine Aktivierung des Proteins durch das kleine G-Protein benötigt werden. Es gibt die starke GTP-abhängige Interaktion zwischen dem Ras-Protein und der RA-Domäne von Cyr1 und eine weitere schwache Interaktion, die unabhängig von der RA-Domäne erfolgt (Crechet et al., 2000; Crechet et al., 2003).

Die RA-Domäne von Ste50 liegt im carboxyterminalen Bereich des Proteins. Sie scheint nicht nur die Interaktion mit Ras zu vermitteln, sondern auch mit anderen kleinen G-Proteinen wie Cdc42 (Spode, 2003; Hopp, 2005; Tatebayashi et al., 2006). Eine Interaktion von Ste50 mit Ras Proteinen konnte in vivo und in vitro gezeigt werden (Hopp, 2005). Der C-terminale Bereich von Ste50 ist essentiell für dessen Funktion während der Antwort auf das Paarungspheromon, der Induktion vom invasiven Wachstum und der hochosmolaren Stressantwort (Ramezani-Rad et al., 1992; Xu et al., 1996). Mutanten mit einer carboxyterminalen Deletion, können nur noch mit einer 0,1-0,2% Effizienz paaren und weisen eine deutlich niedrigere Sensitivität gegenüber Pheromon auf (Ramezani-Rad et al., 1992; Xu et al., 1996). Schon ein Verlust von vierundzwanzig Aminosäuren am C-Terminus führt zu einem Funktionsverlust (Wu et al., 1999). Auch im hochosmolaren Antwortweg, zeigt die Deletion des C-Terminus einen Verlust der Funktion (Wu et al., 1999). Es gibt auch Punktmutationen (*ste50*<sup>267A,L268A</sup>, *ste50*<sup>K254A</sup>) in der RA-Domäne, die das invasive Wachstum in Haploiden abschwächen und die Osmosensitivität erhöhen (Truckses et al., 2006). Diese Mutanten sind gegenüber wildtyp *STE50* dominant. Wird Ste50 unter Überexpression zur Plasmamembran rekrutiert, so wird die Notwendigkeit der RA-Domäne im HOG-Signalweg und im Filamentösen-Wachstumsweg aufgehoben (Wu et al., 2006; Truckses et al., 2006; Tatebayashi et al., 2006). Ob dies auch für den Pheromonantwortweg zutrifft und ob sich diese Phänotypen unter Eigenpromotorbedingungen zeigen, ist bisher nicht untersucht worden. Wird die RA-Domäne von Ste50 hingegen alleine exprimiert, so zeigen die Zellen nicht nur einen leichten Wachstumsdefekt, sondern sie unterdrückt auch die Bildung von Pseudohyphen, die durch die Expression des hyperaktiven Ras2<sup>val19</sup> ausgelöst wird (Truckses et al., 2006).

Es gibt Ste50 Homologe in anderen Pilzen. Diese weisen immer eine SAM Domäne und eine RA Domäne auf, können aber auch weitere Domänen beinhalten, wie z.B. das

*Ustilago maydis* Homolog Ubc2 mit einer SH3 Domäne. Wird die RA Domäne von Ubc2 deletiert, können die Zellen nicht mehr filamentös wachsen (Klosterman *et al.*, 2008). In dem Pflanzenpathogen *Magnaporthe grisea* konnte nicht nur gezeigt werden, dass die RA Domäne von Mst50 für die Virulenz benötigt wird, sondern auch, dass Mst50 mit den kleinen G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 interagiert (Park *et al.*, 2006).

### 1.3 Zielsetzung

Das Protein Ste50 ist an drei MAPK-Signalwegen beteiligt, welche die Antwort auf Paarungspheromon, das filamentöse Wachstum und die Antwort auf hyperosmolare Bedingungen einleiten. Ste50 ist nicht an der eigentlichen Phosphorylierungskaskade beteiligt, sondern dient als Hilfsprotein in der Signalweiterleitung. Ste50, ein regulatorisches Adaptorprotein der MAPKKK Ste11, kennzeichnet sich durch drei distinkte Bereiche aus. Im N-terminalen Bereich liegt die SAM-Domäne (steril-alpha-motif) und am carboxyterminalen Bereich liegt die RA-Domäne (Ras Association). Beide werden durch eine Serin/Threonin reiche Region verbunden. Ste50 wird, durch die Interaktion mit Ste11 und den rezeptorassoziierten G-Protein Effektoren zu einem Bindeglied in der Signalkette. Hierfür ist die RA-Domäne von Ste50 als Verbindung zu den G-Proteinen von entscheidender Wichtigkeit. Ziel dieser Arbeit ist es Ste50 als Regulator der MAPK-Signalwege genauer zu charakterisieren. Die Bedeutung einiger Punktmutationen der RA-Domäne auf die Funktion des Proteins wird ebenfalls erarbeitet. Dafür sollen die Hefezellen mit mutiertem *STE50* den verschiedenen Reizen (Pheromon, Nahrungsmangel und osmotischer Stress) ausgesetzt und die Funktion der Mutanten untersucht werden. Zusätzlich wird auch die Interaktion von Ste50 und den RA-Mutanten überprüft. Da Ste50 mit den kleinen G-Proteinen, Ras1, Ras2 und Cdc42 sowie dem kleinen Transmembranprotein Opy2 interagiert, soll bestimmt werden, ob auch die RA-Mutanten mit diesen Proteinen interagieren.

Wie sich eine Plasmamembranrekrutierung von Ste50 aus dessen Funktion als regulatorischer Adaptor von Ste11 auswirkt wird ebenfalls dargestellt. Da die Interaktionspartner der RA-Domäne alle an der Plasmamembran lokalisiert sind, könnte es für die Funktion von Ste50 wichtig sein, dorthin rekrutiert zu werden. Es soll daher ein Ste50- $\Delta$ RA Protein an die Plasmamembran gebunden und dann die Zellen auf Veränderungen in der Signalweiterleitung im Vergleich zum Wildtyp Ste50 untersucht werden. Dies wird zeigen, ob eine Modulation der Signalstärke und Signaldauer der Pheromon-Antwort, der Induktion des filamentösen Wachstums und der Antwort auf hyperosmolaren Stress sich zeigt. Es soll auch überprüft werden, ob plasmamembranrekrutiertes Ste50 Deletionen von in den Signalwegen oberhalb

angesiedelten Gene komplementieren kann. So kann man Rückschlüsse auf die Funktion und die Aktivierungsmechanismen von Ste50 erhalten.

Desweiteren soll festgehalten werden, wie sich plasmamembranrekrutiertes Ste50- $\Delta$ RA in der Zelle lokalisiert. Auch wird geklärt, ob sich die Verteilung nach Induktion der Signalwege verändert, wie es bereits für wildtypisches Ste50 gezeigt wurde.

## 2 MATERIAL & METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Hefestämme und Medien

##### 2.1.1.1 Hefestämme

**Tabelle 2-1 Liste der zur Verfügung gestellten Stämme**

Stammmname	Genotyp	Referenz/Herkunft
W303-1A	<i>MATa</i> W303-1A <i>leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100</i>	Labor Rothstein Columbia University, New York (HGX10)
WAM4	<i>MATa</i> W303-1A <i>ste50::ura3</i> nach 5FOA-Selektion	Xu <i>et al.</i> , 1996 (HFB93)
HCH164	<i>MATa</i> W303-1A <i>ssk1::KAN ste20::TRP1</i>	Laborsammlung
HCH253	<i>MATa</i> W303-1A <i>ssk1::kanMX sho1::KAN</i>	Laborsammlung
HCH497	<i>MATa</i> W303-1A <i>fus3::loxP-KAN MX-loxP</i>	Hopp, 2005
HCH100	<i>MATa</i> W303-1A <i>ste50::ura3</i> nach 5FOA-Selektion; <i>ssk1::loxP-KAN MX-loxP</i>	Hopp, 2005
HCH129	<i>MATa</i> W303-1A <i>ste50::ura3</i> nach 5FOA-Selektion; <i>ssk1::loxP-kan MX-loxP</i> (Cre-Rekombinase)	Hopp, 2005
MR12	<i>MATa/α leu2 ::hisG/leu2 ::hisG ; ura3-52/ura3-52 ; leu2 ::FLO11lacZ-LEU2 ::leu2</i>	S.Rupp, Fraunhofer-Institut, Stuttgart (HF739)
HFB750	<i>MAT a</i> MR12-A <i>leu2::hisG; ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2</i>	Laborsammlung
FY753	<i>MATa</i> MR12-A <i>leu2::hisG; ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2 ste50 ::ura3</i> nach 5FOA-Selektion	Jansen <i>et al.</i> , 2001 (HHG848)
HSK267	<i>MATa</i> MR12-A <i>leu2::hisG; ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2 ras2 ::kanMX</i>	Laborsammlung
HSK256	<i>MATa</i> MR12-A <i>leu2::hisG; ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2 ste50 ::ura3</i> nach 5FOA-Selektion <i>ras2 ::kanMX</i>	Laborsammlung
GY132	<i>MATa/α ste50::hisG ura3 /ste50:: hisG ura3</i>	Ramezani Rad <i>et al.</i> , 1998 (HLS265)
HCH285	<i>MATa</i> W303-1A <i>leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste11::ADE2 hog1::TRP1</i>	Laborsammlung
HCH286	<i>MATa</i> W303-1A <i>leu2-3,112 ura3-1</i>	Laborsammlung

	<i>trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3 FOA hog1::TRP1</i>	
HCH288	<i>MATa W303-1A leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 hog1::TRP1</i>	Laborsammlung
HCH92	<i>MATa W303-1A leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ssk1::kan</i>	Laborsammlung
PJ187	Twohybrid-Reporterstamm, <i>MATa/α</i> , <i>GAL<sub>(UAS)</sub>LacZ<sub>3</sub></i> , <i>GAL<sub>(UAS)</sub>ADE2</i> , <i>GAL<sub>(UAS)</sub>HIS3</i> , (Laborsammlung, Kreuzung aus Y187 + PJ69 4A) <i>leu2 trp1</i>	Jansen <i>et al.</i> , 2001
Y187	<i>MATα gal4 gal80 leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 URA3::GAL1-lacZ</i>	Clontech
PJ69 4A	<i>MATa LYS2::GAL1-His3 GAL2-ADE2 met2:GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996

**Tabelle 2-2 Liste der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Stämme von *Saccharomyces cerevisiae***

Stammname	Genotyp	Referenz
HNB165	<i>MATa W303-1A ste50::ura3::Myc-nste50FAR-loxp-Kan MX-loxp</i>	diese Arbeit (siehe 3.3.1 und Anhang 9)
HNB166	<i>MATa W303-1A ste50::ura3::Myc-nste50FAR-loxp-Kan MX-loxp</i>	diese Arbeit (siehe 3.3.1 und Anhang 9)
HNB167	<i>MATa W303-1A ste50::ura3::Myc-nste50FAR:loxp-Kan MX-loxp ssk1::kan</i>	diese Arbeit (siehe 3.3.1 und Anhang 9)
HNB168	<i>MATa W303-1A ste50::ura3::Myc-nste50FAR:loxp-Kan MX-loxp ssk1::kan</i>	diese Arbeit (siehe 3.3.1 und Anhang 9)
HNB204	<i>MATa W303-1A leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 hog1::TRP1 opy2::HIS3</i>	diese Arbeit (Anhang 7)
HNB210	<i>MATa W303-1A leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 opy2::HIS3</i>	diese Arbeit (Anhang 1)
HNB212	<i>MATa W303-1A ste50::ura3 opy2::HIS3</i>	diese Arbeit (Anhang 2)
HNB213	<i>MATa W303-1A ste50::ura3 ssk1::kan opy2::HIS3</i>	diese Arbeit (Anhang 3)
HNB215	<i>MATa W303-1A ssk1::KAN opy2::HIS3</i>	diese Arbeit (Anhang 4)
HNB216	<i>MATa W303-1A ste50::ura3::Myc-nste50FAR-loxp-Kan MX-loxp opy2::HIS3</i>	diese Arbeit (Anhang 5)
HNB218	<i>MATa W303-1A ste50::ura3::Myc-nste50FAR-loxp-Kan MX-loxp ssk1::kan</i>	diese Arbeit (Anhang 6)

	<i>opy2::HIS3</i>	
HNB287	<i>MATa MR12-A leu2::hisG; ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2 opy2::KAN</i>	diese Arbeit (Anhang 8)

### 2.1.1.2 Medien für Hefe

**Tabelle 2-3 Für *Saccharomyces cerevisiae* verwendete Medien**

<b>YPD</b>	1% Hefeextrakt, 2% Bacto - Pepton, 2% Glukose
<b>YPD + G418</b>	1% Hefeextrakt, 2% Bacto - Pepton, 2% Glukose, 200 µg Geneticin zur Selektion von resistenten Kolonien
<b>SLAD</b>	0,15% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat, 4% Glukose
<b>SD</b>	0,67% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 2% Glukose, 100 ml / L Aminosäuren- Drop-out-Mix x + Aminosäuren für die die zu kultivierenden Zellen auxotroph sind.
<b>SRG</b>	0,67% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 3% Raffinose, 1% Galaktose, 100 ml / L Aminosäuren- Drop-out-Mix + Aminosäuren für die die zu kultivierenden Zellen auxotroph sind.
<b>Aminosäuren-Drop-out-Mix</b>	0,8 g/L folgender Chemikalien: Adenin, Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Inositol, Isoleucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin 0,08 g/L p-Aminobenzoësäure

Für feste Medien wurde 2% Agar zugegeben.

## 2.1.2 *Escherichia coli* Stämme und Medien

### 2.1.2.1 *E. coli* Stämme

**Tabelle 2-4 Verwendete *E. coli* Stämme**

<b>XL1 Blue</b>	F' proAB lacI <sup>q</sup> ΔM15Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac (Stratagene, La Jolla, U S A)
-----------------	--

### 2.1.2.2 Medien zur Kultivierung von *E. coli*

**Tabelle 2-5 Liste der verwendeten *E. coli* Medien**

<b>LB</b>	1,0% Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl
<b>LB amp</b>	1,0% Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl, 50 µg/ml Ampicillin

### 2.1.3 Plasmide und Oligonukleotide

#### 2.1.3.1 Plasmide

**Tabelle 2-6 Zur Verfügung gestellte Plasmide**

Name	Genotyp und Merkmale			Quelle/Referenz
	Beschreibung	Marker	CEN/2µ	
pUG27	<i>TEF2</i> -Promotor, <i>TEF2</i> -Terminator <i>loxP</i> - <i>HIS3</i> - <i>loxP</i> -Disruptionskassette	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>HIS3</i>	2µ	Gueldener <i>et al.</i> , 1996 (EAP11)
pMG10	YEP13 <i>FUS1</i> -Promotor, Reporterplasmid	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>lacZ</i> <i>LEU2</i>	2µ	Laborsammlung (EFB13)
pMP253	( <i>CYC1</i> -(2x <i>CRE</i> ))- <i>lacZ</i> Reporterplasmid	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>lacZ</i> <i>TRP1</i>	2µ	Proft <i>et al.</i> , 2001
pFG(TyA)- <i>lacZ</i> - <i>URA3</i>	pFG(TyA)- <i>lacZ</i> - <i>URA3</i> , Reporterplasmid	<i>URA3</i>	2µ	Mösch <i>et al.</i> , 1996 (EFB309)
pFG(TyA)- <i>lacZ</i> - <i>LEU2</i>	pFG(TyA)- <i>lacZ</i> - <i>LEU2</i> , Reporterplasmid	<i>LEU2</i>	2µ	Mösch <i>et al.</i> , 1996 (EFB311)
p413STE50	pAB p413 <i>STE50</i> -Promotor,	<i>HIS3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS383)
pGREG526	pRS416-Derivat <i>GAL1</i> -Promotor, Myc, <i>CYC1</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Jansen <i>et al.</i> , 2005 (EWK75)
pRS416- <i>GAL</i> p-Myc- <i>STE50</i>	pRS416 <i>GAL</i> -Promotor Myc, <i>STE50</i> , <i>CYC1</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (ELS164)
p416- <i>STE50</i> p-Myc- <i>STE50</i>	pRS416 <i>50</i> -Promotor Myc, <i>STE50</i> , <i>CYC1</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Laborsammlung (EFB268)

pRS-Galp-GST-STE50 <sup>R296G,N301S</sup>	pRS416 <i>GAL1</i> -Promotor, GST Ste50-RA20	<i>URA3</i>	CEN	Spode, 2003 (ELS465)
pGREG546	pRS416-Derivat <i>GAL1</i> -Promotor, GST, <i>CYC1</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Jansen <i>et al.</i> , 2005 (EWK83)
pGREG576	pRS416-Derivat <i>GAL1</i> -Promotor, GFP, <i>CYC1</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Jansen <i>et al.</i> , 2005 (EWK85)
pMBD	Twohybrid <i>GAL4</i> -DNA-Bindedomäne	<i>TRP1</i>	CEN	Jansen <i>et al.</i> , 2005 (EWK67)
pAD2	Twohybrid <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne	<i>LEU2</i>	CEN	Jansen <i>et al.</i> , 2005 (EWK66)
pAD2- <i>HIS3</i>	Twohybrid <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne, <i>HIS3</i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ELS552)
pMBD- <i>STE50R296GN301S</i>	<i>MET</i> -Promotor BD- <i>STE50R296GN301S</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (ELS563)
pMBD- <i>STE50</i>	<i>MET</i> -Promotor -BD- <i>STE50</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung (ECH199)
pAD- <i>STE11</i>	<i>ADH</i> - Promotor -AD- <i>STE11</i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung (ELS243)
ECH163	pAD- <i>RAS1F</i> (ohne C-terminale CAAX-Box)	<i>LEU2</i>	CEN	Hopp, 2005
ECH167	pAD- <i>RAS2F</i> (ohne C-terminale CAAX-Box)	<i>LEU2</i>	CEN	Hopp, 2005
ECH157	pAD- <i>RAS2</i> <sup>val19F</sup> (ohne C-terminale CAAX-Box)	<i>LEU2</i>	CEN	Hopp, 2005
ECH191	pMBD- <i>STE50P318L</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Hopp, 2005
ECH192	pMBD- <i>STE50L322S</i>	<i>TRP1</i>	CEN	Hopp, 2005
EFB67	pAD- <i>Cdc42</i>	<i>LEU2</i>	CEN	Laborsammlung
YCPRAS2Val19	YCPRAS2Val19	<i>URA3</i>	CEN	Gimeno <i>et al.</i> , 1992 (EGX156)

METKB50-4	<i>MET</i> -Promotor, KB, <i>nSTE50</i> (1-252)	<i>TRP1</i>	CEN	Laborsammlung, (EGX393)
pCDC25/SUP/2	pCDC25/SUP/2 (PK-25) ( <i>TPK1</i> )	<i>URA3</i>	2 $\mu$	Lisziewicz <i>et al.</i> , 1987 (EHG99)

Tabelle 2-7 Im Rahmen dieser Arbeit erstellte Plasmide

Name	Genotyp und Merkmale			Konstruktion
	Beschreibung	Marker	Cen/2 $\mu$	
ENB13	pGREG526 STE50 <sup>V286A</sup>	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG526 mit Assembly-PCR Produkt p416GALGSTSTE50-RA2 + A72REC1-STE50, A129Ste50_RA870rev; p416GALpMYCSTE50 + A130ste50_RA870for, A73rec2-ste50)
ENB15	pGREG526 STE50 <sup>P318L</sup>	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG526 mit Assembly-PCR Produkt (p416GALpGSTSTE50 + A72REC1-STE50, A129Ste50_RA870rev; p416GALMycSTE50-RA2 + A130ste50_RA870for, A73rec2-ste50)
ENB17	pGREG526 STE50 <sup>N301S</sup>	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG526 mit Assembly-PCR Produkt (p416GALpGSTSTE50 + A72REC1-STE50, A129Ste50_RA870rev; p416GALMycSTE50-RA20 + A130ste50_RA870for, A73rec2-ste50)
ENB19	pGREG526 STE50 <sup>R283T</sup>	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG526 mit Assembly-PCR Produkt (p416GALGSTSTE50-RA64 + A72REC1-STE50, 129Ste50_RA870rev; p416GALpMYCSTE50 + A130ste50_RA870for, A73rec2-ste50)
ENB21	pGREG526 STE50 <sup>L322S</sup>	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG526 mit Assembly-PCR Produkt (p416GALpGSTSTE50 + A72REC1-STE50, A129Ste50_RA870rev; p416GALMycSTE50-RA64 + A130ste50_RA870for, A73rec2-ste50)
ENB71	pGREG526 nSTE50(AS1-234)FAR(Ras2 AS312-322)	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG526 mit Doppel-PCR Produkt (p416GALpGSTSTE50 + A72REC1-STE50, A191R2FARNS50, A72REC1-STE50, A89rec2-ras2)

ENB85	p526p50, Myc,	URA3	CEN	Ligation von STE50-Promotor Fragment ( <i>SacI/SpeI</i> ) aus ELS383 in pGREG526 Nach Restriktion mit <i>SacI/SpeI</i>
ENB111	p526p50, Myc <i>nste50FAR</i>	URA3	CEN	Ligation von <i>nste50FAR</i> Fragment ( <i>EcoRI/XhoI</i> ) aus ENB 71 in ENB 85 nach Restriktion <i>EcoRI/XhoI</i>
ENB187	p526p50, Myc <i>nste50FAR</i> , <i>STE50</i> <i>Term</i>	URA3	CEN	In vivo rekombination von <i>Ste50 Terminator</i> (419bp) nach PCR mit A231 und A232 in Plasmid ENB111 nach Restriktion mit <i>PacI</i>
ENB156	pGREG526 -STE50	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG526 mit PCR Produkt von EFB268 + A72REC1-ste50. A73REC2-ste50
ENB130	pGREG576 - nSTE50FAR	URA3	CEN	hom. Rekombination von pGREG576 Doppel-PCR (p416GALpGSTSTE50 + A72REC1-STE50, A191R2FARNS50; A72REC1-STE50, A89rec2-ras2)
ENB131	p526p50 nSTE50(aa 1-252)	URA3	CEN	ligation von <i>nste50</i> Fragment ( <i>SaI</i> ) aus EGX393 mit ENB 85 nach Restriktion <i>SaI</i>
ENB166	pAD-OPY2- C1 (AS 116-361)	LEU	CEN	hom. Rekombination von pAD <sub>2</sub> -His3 (ELS552) mit Assembly-PCR Produkt A322REC1OPY2 + A332REC2OPY2-C1

### 2.1.3.2 Oligonukleotide (Primer)

Name	Sequenz (5´-3´)	Verwendung
A72REC1-ste50	gaa ttc gat atc aag ctt atc gat acc gtc gac aat gga gga cgg taa aca ggc ca	Homologe Rekombination Ste50
A73REC2-ste50	gcg tga cat aac taa tta cat gac tcg agg tcg act tag agt ctt cca ccg ggg gt	Homologe Rekombination Ste50
A89rec2-ras2	gcg tga cat aac taa tta cat gac tcg agg tcg act taa ctt ata ata caa cag cc	Homologe Rekombination Ras2
A191R2FARNS50	tta act tat aat aca aca gcc acc cga tcc gct ctt gga ggc aga ttg gtt tgt aga	Überlappungs PCR Zur Assemblierung von nSTE50FAR
A129RA870for	tat ggg gat caa gag agg ctg tta g	Überlappungs PCR zur Trennung von <i>STE50</i> Mutanten
A130RA870rev	cta aca gcc tct ctt gat ccc cat a	Überlappungs PCR zur Trennung von <i>STE50</i> Mutanten
A260kan-B	gga tgt atg ggc taa atg	Nachweis Disruption
A261kan-C	cct cga cat cat ctg ccc	Nachweis Disruption
A231Ste50TF	aca tta tac gaa gtt ata tta agg gtt gtc tta att gtg cag ttg tca tgc ac	Amplifizieren des <i>STE50</i> Terminator

A232Ste50TR	ggg agc ccc cga ttt aga gct tga cgg gga aag ccc aat tcc ata aga aag aa	Amplifizieren des <i>STE50</i> Terminator
A320opy2T300	ctg ctg cgg aac tta tcc	Nachweis Disruption Opy2
A321OPY2P439	ccg agc tcc cga acc agg tga tca gc	Nachweis Disruption Opy2
A323REC1OPY2- C1	gaa ttc gat atc aag ctt atc gat acc gtc gac a	Homologe Rekombination Opy2-C1
A323REC2OPY2	gcg tga cat aac taa tta cat gac tcg agg tcg act tat cgt tca tcg tgt att tcg	Homologe Rekombination Opy2
A324opy2-5D	cat tta tca aac tgg tta cgt tcg ttt tct gaa aat caa aca aaa aca gct gaa gct tcg tac gc	Disruption Opy2
A325opy2-3D	tat aat att ttc ccc ggg att gca gaa tac tgac acg cct ttt atg cat agg cca cta gtg gat c	Disruption Opy2

## 2.1.4 Chemikalien und Antikörper

### 2.1.4.1 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
$\alpha$ Myc	Monoklonal aus Maus, gegen Myc-9E10 Verdünnung 1:1000	Calbiochem
$\alpha$ Maus	Polyklonal aus Ziege gegen Maus IgG, gekoppelt an alk. Phosphatase 1:5000	Dianova

**2.1.4.2 Chemikalien**


---

Acros Organics	Galaktose, Lysin
Bio-Rad	Bio-Rad Protein Assay
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm Ø
Caesar & Loretz	Glukose
Difco	Bacto Agar, Hefe-Extrakt, Pepton, Trypton, Yeast nitrogen Base
Fermentas	PAGE-Ruler™ Prestained Protein Ladder
Fluka	Histidin
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonucleasen
Janssen Chimica	DMF, DMSO
J.T. Baker	KAc, MgCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, , RbCl <sub>2</sub>
Merck	APS, Adenin, EDTA, Leucin, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , TEMED
MWG Biotech	Synthetische Oligonukleotide
New England Biolabs	Restriktionsendonucleasen, BSA
Pharmacia	dNTP-Mix, Glutathion-Sepharose, ProteinA-Sepharose
Qiagen	Plasmid Mini Kit, Plasmid Midi Kit, Qiaex II Gel Extraction Kit
Riedel-deHaën	Essigsäure, Ethanol, NaN <sub>3</sub> , Methanol
Roche	BCIP, Expand High Fidelity PCR System, Lumi-Light Western-Blotting-Substrat, Protease-Inhibitoren: Antipain, Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, Restriktionsendonucleasen
Roth	DTT, Gel30 Acrylamid, Glycin, Isopropanol, KCl, PEG4000 und 3350, Tryptophan
Schleicher & Schuell	Nitrocellulose-Membran
Serva	BSA, Glyzerin, Raffinose, SDS, Tween20
Sigma	Ampicilin, Etidium Bromid, Litium Acetat, NBT, ONPG, PMSF, Tris, α-Faktor, Uracil
Whatman	3 MM Papier

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Amplifikation von DNA mittels PCR (Polymerase Chain Reaktion)

#### 2.2.1.1 Amplifikation von Plasmid-DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde unter Verwendung der High-Expand-Polymerase der Firma Roche durchgeführt. Jeder Ansatz von 100 µl Endvolumen enthielt 10 µl 10 × Puffer, 0,1 ng der zu amplifizierenden Plasmid-DNA, je 0,1 nmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer und 200 µM dNTP-Mix. Die Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Thermo-Cycler (Techne). Zur Amplifikation wurde folgendes Temperaturzyklusprogramm verwendet:

**Tabelle :** PCR-Programm zur Amplifizierung von Plasmid-DNA

	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Funktion
1.	1x	95°C	10 min	Denaturierung der DNA
2.	20x	95°C	1min	Denaturierung der DNA
		45-55°C Abhängig von Primern	1min	Bindung der Primer an die DNA
		68°C	1 min pro kb des zu amplifizierenden Fragmentes	DNA-Synthese
3.	1x	68°C	10 min	abschließende DNA-Synthese

Nach abgeschlossener Reaktion wurde 1/10 der amplifizierten DNA durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### 2.2.1.2 PCR von Zellen

Die (PCR) für den Nachweis der korrekten Disruption wurde unter Verwendung der Taq-Polymerase durchgeführt. Frisch ausgestrichene Zellen wurden in 50 µl 0,02 M NaOH resuspendiert und für 120 Sekunden in der Mikrowelle erhitzt. Die Zellsuspension wurde bei -20°C für mindestens eine Stunde eingefroren. Von diesem Ansatz wurden 5 µl für die PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz mit einem gesamt Volumen von 50 µl enthielt weiterhin einen Puffer, H<sub>2</sub>O, DMSO, 0,1 nmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer und 200 µM dNTP-Mix. Die Reaktion erfolgte in einem programmierbaren Thermo-Cycler (Techne). Zur Amplifikation der DNA wurde folgender Reaktionszyklus verwendet:

**Tabelle :** PCR-Programm zur Amplifizierung von genomischer DNA

	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer	Funktion
1.	1x	95°C	10 min	Denaturierung der DNA
2.	35x	95°C	1min	Denaturierung der DNA
		45-55°C Abhängig von Primern	1min	Bindung der Primer an die DNA
		68°C	1 min pro kb des zu amplifizierenden Fragmentes	DNA-Synthese
3.	1x	68°C	10 min	abschließende DNA-Synthese

Nach abgeschlossener Reaktion wurden 30 µl des gesamten PCR-Ansatzes durch Agarose-gelelektrophorese analysiert.

### 2.2.2 Gen Deletion in *Saccharomyces cerevisiae*

Gen-Deletionen in *S. cerevisiae* wurden durch homologe Rekombination von Markern in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Deletion des gewünschten Gens erzielt. Dazu wurden Disruptionsplasmide verwendet, die eine Amplifikation der Disruptionskassette in *E. coli* erlaubten. Die Gendisruption in *S. cerevisiae* wurde nach der von Gueldener *et al.* (1996) beschriebenen, auf PCR basierenden Methode der Gendeletion durchgeführt. Hierbei wurden 60mere Oligonukleotide verwendet, deren 20 3'-ständigen Basen die Amplifikation eines Selektionsmarkers erlauben, der auf einem Plasmid vorliegt. Die 40 5'-ständigen Basen sind genspezifisch und erlauben die homologe Rekombination. Mittels PCR wurde die LoxP-kanMX-LoxP-Kassette aus dem Plasmid pUG6, oder die LoxP-HIS3-LoxP-Kassette aus dem Plasmid pUG27 amplifiziert. Das PCR Produkt wurde mittels des QiaQuick-PCR Purification Kits aufkonzentriert. Das aufkonzentrierte PCR-Produkt wurde in Hefezellen mittels der High-efficiency LiAc-Methode transformiert. Der Erfolg der Gendeletion wurde mittels PCR mit Oligonukleotiden überprüft, die sowohl außerhalb der zur Deletion verwendeten Deletionskassette im Genom als auch innerhalb der Deletionskassette binden. Somit wird nur bei korrekter Insertion bei der PCR ein Produkt mit bestimmter Größe erzeugt.

### 2.2.3 Transformation

#### 2.2.3.1 Transformationen in *Saccharomyces cerevisiae*

##### Schnelltransformation in Mikrotiterplatten

Es wurden frische Hefezellen in 200 µl Lsg 3 resuspendiert. Anschließend wurde ca. 1 µg Plasmid-DNA, 10 µl denaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml) und 10 µl 1 M DTT hinzugegeben. Danach wurde der Ansatz für 6-8 Stunden bei 30°C bzw. über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C. Die Zellen wurden auf den jeweiligen Selektivplatten ausplattiert und für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

##### Lösungen

Lsg 3: 40% PEG4000 in 0,1 M Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

### **High efficiency Transformation von Hefe nach der Lithiumacetatmethode**

Die Transformation von Hefe wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt. 100 ml einer Kultur der OD<sub>600</sub> 0,4 bis 0,6 wurden abzentrifugiert (3000 rpm Beckmann GPKR-Zentrifuge), die Zellen einmal in 0,1 M LiAc gewaschen, in 1 ml 0,1 M LiOAc resuspendiert und in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Zu den Ansätzen wurde 1 µg Plasmid-DNA, 10 µl Carrier-DNA und 700 µl Lsg 3 hinzugegeben. Die Ansätze wurden anschließend für 30 min bei 30°C inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock über 15 min bei 42°C. Die Zellen wurden abzentrifugiert (7000 rpm, 2 min Eppendorf, 5417R), in 200 µl Wasser aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Danach erfolgte die Inkubation der Platten für 2-3 Tage bei 30°C.

#### **Lösungen**

Lsg 3: 40% PEG4000 in 0,1 M Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

### **2.2.3.2 Transformationen in *E. coli***

#### **Elektroporation**

400 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die logarithmisch wachsenden Zellen (OD<sub>600</sub> 0,6 bis 1) wurden für 15-30 min auf Eis inkubiert. Die Kultur wurde daraufhin 15 min bei 3000 rpm (Beckmann GPKR-Zentrifuge) und 4°C abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit einem Volumen H<sub>2</sub>O, einmal mit zwei Volumen H<sub>2</sub>O und einmal mit 1/50 Volumen 10% Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 2 ml 10% Glycerin aufgenommen und auf 40 µl Aliquots verteilt, die bei -70°C gelagert wurden.

40 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 50 µl verdünnter DNA (~1 ng) versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 1 mm) gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit dem Gene-Pulser<sup>TM</sup>/Pulse Controller (Biorad, München) [1,6 kV; 25 µF; 200 Ohm]. Zellen wurden in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie 2 min bei 7000 rpm (Eppendorf, 5417R) abzentrifugiert, das Zellpellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und auf LB<sub>amp</sub>-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **High-Efficiency Transformation nach Hanahan**

Um kompetente *E. coli*-Zellen herzustellen, ließ man Zellen über Nacht in 5 ml SOB-Medium mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> wachsen (Hanahan 1991). Anschließend wurden 100 ml SOB mit 20 mM MgSO<sub>4</sub> mit der Übernachtskultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,2 angeimpft. Diese Kultur wuchs bei 37°C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,6, dann wurde sie 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 4100 rpm (Beckmann J2-21 Zentrifuge) und 4°C

für 10 min wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 20 ml kaltem FSB-Puffer (*Frozen storage buffer*) resuspendiert (Beckmann J2-21 Zentrifuge) und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4100 rpm (Beckmann J2-21 Zentrifuge) und 4°C für 10 min, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml kaltem FSB-Puffer resuspendiert, 140 µl DMSO hinzugegeben und gevortext (IKA-Vibrax Janke und Kunkel). Die Suspension wurde für 15 min auf Eis inkubiert, anschließend abermals 140 µl DMSO zugegeben und gevortext. Die Suspension wurde in 50 µl-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 1-5 ng DNA auf ca. 50 µl Zellen gegeben, es wurde 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock im Wasserbad (Julabo R5) bei 42°C für 90 sec. Danach wurden die Zellen auf Eis überführt, kurz auf 37°C angewärmt und nach Zugabe von flüssigem LB-Medium für 45 min im 37°-Raum auf den Schüttler (B. Braun Biotech) gestellt. Anschließend wurden 200-300 µl des nicht abzentrifugierten Gesamtansatzes auf LB<sub>amp</sub>-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### Lösungen

SOB-Medium: 950 ml ddH<sub>2</sub>O, 20g Bacto-Trypton, 5g Bacto Yeast-Extract, 0,5g NaCl, 10 ml 250 mM KCl, pH mit 5 N NaOH auf 7,0 einstellen.

FSB-Puffer: 10 mM KAc, 45 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 3 mM Hexamminkobalt Chlorid, 10% Glycerol

## 2.2.4 Präparation von Nukleinsäuren

### 2.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode der alkalischen Lyse. Hierfür wurden 5 ml Übernachtskultur abzentrifugiert und in 100 µl P1 resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2. Zur Neutralisierung erfolgte die Zugabe von 200 µl P3. Aus dem nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4°C erhaltenen Überstand wurde die Plasmid-DNA durch eine Ethanol-fällung (100%) und einem anschließenden Waschschrift mit 70% Ethanol gewonnen.

### Lösungen

P1: 150 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA

P2: 0,2 M NaOH; 1% SDS

P3: 3 M KOAc; pH 5,5

#### **2.2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae***

Hefezellen einer 5 ml Übernachtskultur wurden geerntet und mit de-ionisiertem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml P1 mit RNase resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml P2 gemischt. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Zugabe von 2/3 Volumen Glasperlen auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) unter Schütteln bei 4°C, 15 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml P3 versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und 15 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf, 5417R). Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl deionisiertem Wasser aufgenommen und die DNA wurde im Anschluss für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

#### **2.2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA**

Die Analyse der DNA erfolgte über die Auftrennung in neutralen Agarosegelen (Agarose in 1 × TAE mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zur Anfärbung der Nukleinsäuren). Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei analytischen Gelen bei maximal 120 V, bei präparativen Gelen bis 80 V. Als Längen- und Konzentrationsstandard diente 1 µg *EcoRI/HindIII* geschnittene Lambda-DNA.

#### **Lösungen**

TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl pH 7,8; 20 mM Natriumacetat; 2 mM EDTA

Blaumarker: 0,2% Bromphenolblau; 25% Glycerol

#### **2.2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration hochmolekularer DNA wurde durch Vergleich mit einem DNA-Mengenstandard (*EcoRI/HindIII* geschnittene Lambda-DNA) in einem Agarosegel abgeschätzt.

#### **2.2.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die unter UV-Licht mit Ethidiumbromid auf einem Agarosegel sichtbar gemachte DNA wurde ausgeschnitten und nach dem Qiaquick Gel Extraction Kit Protocol (Qiagen) eluiert.

### 2.2.4.6 DNA-Restriktion

Die Verwendung der Restriktionsendonukleasen erfolgte nach Angaben der Hersteller (Biolabs, Roche). Die Restriktionsansätze wurden je nach Enzym und Bedingung 3 bis 16 h bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurde 1 Unit (U) Enzym eingesetzt.

### 2.2.4.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Für die Entfernung von endständigen 5'-Phosphatgruppen aus linearen doppelsträngigen DNA-Molekülen wurde alkalische Phosphatase (CIP: calf intestinal phosphatase) verwendet. Hierzu wurde nach erfolgter Restriktion 1 U CIP direkt in den Restriktionsansatz gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

### 2.2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit 100 ng dephosphorylierter Vektor-DNA und der dreifachen molaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ . Die Ligation erfolgte bei Verwendung des Ligasepuffers der Firma Gibco BRL in Gegenwart von 1 U T4-Ligase (Gibco BRL) über Nacht bei 16°C.

Für die nachfolgende Transformation in *E. coli* wurde der gesamte Ligationsansatz verwendet

## 2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.5.1 Herstellung von Proteinrohextrakten aus *S. cerevisiae*

Logarithmisch wachsende Kulturen  $\text{OD}_{600}$  0,4-0,6 wurden abzentrifugiert (5 min 3000 rpm Beckmann GPKR-Zentrifuge) und mit  $\text{dH}_2\text{O}$  sowie E-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 150  $\mu\text{l}$  E<sup>+</sup>-Puffer resuspendiert und mit 100  $\mu\text{l}$  Glasperlen (Jansen  $\varnothing$  0,45 cm) versetzt. Der Zellaufschluß erfolgte für 10 Minuten auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) bei 4°C und maximaler Intensität. Nach Aufschluss der Zellen wurden wiederum 150  $\mu\text{l}$  E<sup>+</sup>-Puffer zugegeben und die Flüssigkeit abgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min bei 13.000 rpm, Eppendorf 5417R) wurde der Proteinrohextrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und verwendet oder bei -70°C gelagert.

### Lösungen

E-Puffer: 25 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,1% TritonX-100; 10% Glycerin; 150 mM NaCl

E<sup>+</sup>-Puffer: E-Puffer + 1 mM DTT, 0,1 mM Pi-Mix (Pepstatin, Aprotinin, je 1 mg/ml, Leupeptin, Antipain, je 5 mg/ml), 0,1 mg/ml Trypsin Inhibitori, 1 mM PMSF

### 2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. 790 µl Wasser wurden mit 10 µl Rohextrakt und 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad) vermischt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm die Absorption im Photometer (Beckmann DU 7400) gemessen. Die Proteinmenge im Rohextrakt wurde anschließend anhand einer BSA-Eichkurve mit definierten Proteinkonzentrationen (0 bis 25 µg BSA in 2 µg-Schritten) aus den Absorptionswerten berechnet. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung.

### 2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte nach der Methode von Laemmli, 1970. Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 3%iges Sammelgel und ein 10%iges Trenngel verwendet (Maniatis, 1982). Die Proteinproben wurden mit einem Volumenanteil 2 x Probenpuffer für 5 Minuten bei 95° C gekocht und anschließend 30 Minuten bei 50°C solubilisiert, bevor sie aufgetragen wurden. Die Auftrennung der Proteine und des Molekulargewichtsstandards (Fermentas, Prestained Protein Ladder: 170 kDa; 130 kDa; 100 kDa; 72 kDa; 55 kDa; 40 kDa; 33 kDa; 24 kDa; 17 kDa; 11 kDa) erfolgte in Laufpuffer bei 50 V über Nacht oder für 3-4 h bei 30 mA bei Tag.

#### Lösungen

Sammelgel: 7 ml H<sub>2</sub>O, 1,25 ml Tris (0,4% SDS, 0,5 M Tris HCl pH 6,8) 1,7 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 25 µl 10% APS, 20 µl TEMED

Trenngel: 10 ml H<sub>2</sub>O, 5 ml Tris (0,4% SDS, 1,5 M Tris/ HCl, pH 8,8), 5 ml 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid, 50 µl 10% APS, 40 µl TEMED

2x Probenpuffer: 4% SDS, 50 mM Tris/ HCl pH 6,8, 20% Glycerin, Bromphenolblau, 20 mM DTT

Laufpuffer: 25 mM Tris, 0,192 M Glyzin und 0,1% SDS

### 2.2.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblot)

Nach erfolgter Protein-Auftrennung (SDS-PAGE) wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Übertragung erfolgte in Blot-Puffer für 6 Stunden bei 30 V (250 mA) im Kühlraum. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde der Filter 2 Stunden in PBST inkubiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (1:1000 in PBSTB) erfolgte für 1,5 Stunden bei RT. Nach dreimaligem Waschen für

jeweils 10 Minuten mit PBST (PBSTB ohne BSA) erfolgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper (1:5.000 (Phosphatase) oder 1:50.000 (Peroxidase)) für 4 Stunden oder über Nacht. Auf die folgenden 3 Waschschrirte mit PBST folgte die Detektion des Sekundären Antikörpers.

#### Lösungen

Blotpuffer: 25 mM Tris; 0,192 M Glyzin; 20% Methanol

1x PBSTB: 8g NaCl; 2g KCl; 14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1L pH 7,4  
; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20; 5% BSA

#### 2.2.5.5 Detektion durch Alkalische Phosphatase

Für den Nachweis von mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem sekundären Antikörper wurde die Membran zunächst zweimalig für 5 Minuten in Substratpuffer äquiliibriert. Anschließend erfolgte die Farbreaktion nach Zugabe von 25 ml Substratpuffer mit 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT.

#### Lösungen

Substratpuffer: 0,1 M Tris/HCl pH 8,8; 0,1 M NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>

#### 2.2.5.6 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mit ONPG

Für ONPG-Messungen (2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) nach Miller (1972) wurden 4 OD Zellen geerntet, mit 1 ml LacZ-Puffer gewaschen, anschließend in 300  $\mu$ l LacZ-Puffer resuspendiert und mit Glasperlen (Volumen 100  $\mu$ l,  $\varnothing$  0,45mm) durch fünfzehnminütige Inkubation in einem Vibrax-Schüttler (Firma Janke & Kunkel) aufgeschlossen. Der Überstand wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf, 5417R) und das Pellet wurde verworfen. Der Rohextrakt wurde direkt für Aktivitätsmessungen und Proteinbestimmungen eingesetzt. Die gesamte Bearbeitung erfolgte bei 4°C.

950  $\mu$ l ONPG-Lösung (1 mg/ml Z-Puffer) wurde mit 50  $\mu$ l Rohextrakt versetzt. Über einen Zeitraum von bis zu 2 h wurden die Proben bei 30°C inkubiert und nach schwacher Gelbfärbung mit 0,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung abgestoppt. Es wurde photometrisch die Extinktion bei 420<sub>nm</sub> bestimmt und die Zeit des Abstoppens notiert. Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{V}{\varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{\Delta E}{\Delta t} \quad [\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml} = \text{U}/\text{ml}]$$

$V$  = Küvettenvolumen ( $\mu\text{l}$ );  $v$  = Probenvolumen ( $\mu\text{l}$ );  $d$  = Schichtdicke des Küvetteninhalts;  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient bei 420 nm ( $\epsilon_{420} = 4,5 \text{ ml}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ )  
Die endgültige Angabe der Enzymaktivität erfolgte bezogen auf mg Gesamtprotein.

## Lösungen

Z-Puffer: 0,1 M Natrium-Phosphat, pH 7,0; 20 mM KCl; 1 mM  $\text{MgSO}_4$

## 2.2.6 Weitere Methoden

### 2.2.6.1 Two-Hybrid-Interaktionsnachweis

Das Two-Hybrid-System ist ein genetisches System zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen mittels eines Reportergenes (Fields & Song, 1989; Phizicky & Fields, 1995). Es beruht auf dem modularen Charakter vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. *GAL4* (Giniger *et al.*, 1985) oder *GCN4* (Hinnebusch & Natarajan, 2002). Die Bindedomäne bringt den Transkriptionsfaktor an den Wirkort, d.h. in den Kern und bindet mit Hilfe der DNA-Bindedomäne an spezifische Bindestellen der Promotoren der Gene, welche durch den Faktor reguliert werden. Die Aktivierungsdomäne bindet mit anderen für die Transkriptions-Initiation benötigten Faktoren an den Promotor und aktiviert die Transkription des stromabwärts liegenden Gens (Johnston, 1987). Man fusioniert einen der Interaktionspartner an eine DNA-Bindedomäne und den anderen an eine Aktivierungsdomäne. Durch Expression dieser Fusionsproteine in einem Stamm mit *GAL*-Promotorsequenzen vor Reportergenen kann die Wechselwirkung dieser beiden Proteine zur Transkriptionsaktivierung eines gut messbaren Reportergens (z.B. *lacZ*) führen. Die Menge des gebildeten Reportergenprodukts kann als direktes Maß für die Stärke der Interaktion verwendet werden. Es wurden die Domänen des Transkriptionsaktivators Gal4 verwendet. Als Hefestamm wurde der Stamm PJ187, eine Kreuzung aus PJ-69-4A (James *et al.*, 1996) und Y187 (Durfee *et al.*, 1993) des Genotyps *MATa/α*, *GAL<sub>(UAS)</sub> LacZ<sub>3</sub>*, *GAL<sub>(UAS)</sub> ADE2*, *GAL<sub>(UAS)</sub> HIS3* verwendet. Weiterhin sind die relevanten *GAL*-Gene deletiert. In diesem Stamm kann neben der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität auch das Wachstum auf Minimalmedium ohne Histidin oder Adenin als Maß für die Interaktionsstärke dienen. Wachstum auf Histidin Mangelmedium ist sehr sensitiv, zeigt allerdings einen relativ hohen Hintergrund, es werden viele falsch-positive Interaktionen durch Wachstum angezeigt, dafür werden auch schwache Interaktionen wahrgenommen. Das Hintergrundwachstum auf SD *leu- trp- his-* -Platten kann durch Zugabe von 6 mM 3´Aminotriazol minimiert werden. Die Adenin-Mutation hat stärkere Auswirkungen, hier können nur die Zellen wachsen, die eine sehr starke Interaktion der Fusionsproteine aufweisen.

### **2.2.6.2 Induktion des Paarungspheromon-Antwortweges mit $\alpha$ -Faktor**

Zellen wurden bei  $OD_{600}$  0,6-0,8 mit 1  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor (Endkonzentration) induziert. Die Zellen wurden anschließend mikroskopisch inspiziert oder für eine  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitätsbestimmung geerntet.

### **2.2.6.3 Sensitivitätstest gegenüber Paarungspheromon**

Zur Untersuchung der Sensitivität gegen Paarungspheromon wurden  $1 \times 10^5$  Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur in 5 ml Topagar (0,6%) vermischt und gleichmäßig auf eine Platte gegossen. Es wurden sterile Filterplättchen ( $\varnothing$  5 mm) aufgelegt und  $\alpha$ -Faktor in den Mengen 5  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 1  $\mu$ g und 0,5  $\mu$ g aufgetropft. Die Platten werden anschließend bei 30°C inkubiert.

### **2.2.6.4 Sensitivitätstest gegenüber Hyperosmolarität**

Der Nachweis der Osmostressantwort erfolgte nach Posas und Saito (1997). Logarithmisch wachsende Zellen werden auf Minimalmedium mit und ohne Natriumchlorid oder eines anderen Osmolyts verschiedener Konzentrationen getropft (Verdünnungsreihe 3,5  $\mu$ l  $OD_{600nm}$  0,4 um je einen Verdünnungsfaktor von 10 von links nach rechts abnehmend). Das Wachstum nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30°C wurde protokolliert.

### **2.2.6.5 Induktion des pseudohyphalen Antwortweges**

Die Induktion von Pseudohyphen diploider Zellen erfolgte auf einem Stickstoffmangelmedium (SLAD = Synthetic Low Ammونيا Dextrose) mit 50  $\mu$ M Ammoniumsulfat, wie von Gimeno *et al.* (1992) beschrieben. Logarithmisch wachsende Zellen wurden 1: 1000 in Wasser verdünnt, auf SLAD-Plattten ausplattiert, für 24 h bei 30°C inkubiert und auf pseudohyphales Wachstum hin mikroskopisch untersucht.

### **2.2.6.6 Induktion des Signalweges für Invasives Wachstum in Flüssigmedium**

Zur Induktion des Signalweges wurden Zellen einer stationären Übernachtskultur in frisches Medium gegeben  $OD_{600}$  0,1-0,2. Die Zellen wurden anschließend für mehrere Tage bei 30°C auf einem Schüttler (110 rpm) inkubiert. Proben von mindestens 4  $OD_{600}$  wurden an den gewünschten Zeitpunkten entnommen.

### **2.2.6.7 Induktion des Signalweges für Invasives Wachstum in Festmedium**

Zur Induktion des Signalweges wurden 80 µl einer stationären Übernachtskultur ( $OD_{600}$  10) auf einem 6tel einer Platte vorsichtig ausgestrichen, ohne den Agar zu verletzen. Die Platte wurde anschließend bei 30°C für 2-6 Tage inkubiert. Die Platten wurden dann fotografiert um das gesamte Wachstum festzuhalten. Die Platte mit einem schwachen Wasserstrahl begossen, um Zellen, die nicht adhäsiv wachsen, zu lösen. Die Platte wurde anschließend wieder fotografiert.

### **2.2.6.8 Fluoreszenzmikroskopie**

Aus einer Übernachtskultur in SRG-Medium wurde eine SRG-Hauptkultur angesetzt, diese wurde bei 30°C inkubiert, bis die log-Phase erreicht war. 500 µl dieser Kultur wurden 1 min. bei 5.000 rpm (Haereus, Biofuge) abzentrifugiert und in 150 µl PBS-Puffer gewaschen und in 25 µl PBS-Puffer aufgenommen und am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop; Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht.

Um Zellkulturen zu arretieren, oder um die Effekte einer Pheromonbehandlung zu untersuchen, wurden 5 µM  $\alpha$ -Faktor zu logarithmischen Zellen gegeben und bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie beschrieben für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

### **Lösungen**

1x PBS: 8g NaCl, 2g KCl, 14,4g  $Na_2HPO_4$ , 2,4g  $KH_2PO_4$  ad 1L pH 7,4

### **2.2.6.9 Bioinformatik**

Die Bearbeitung von Plasmidkarten/-Sequenzen und die Möglichkeit zur Konstruktion von Plasmiden erfolgte mit Hilfe von Clone Manager (Version 7.0).

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Untersuchungen zur Funktionalität von Ste50-RA Mutanten in den MAPK Signalwegen

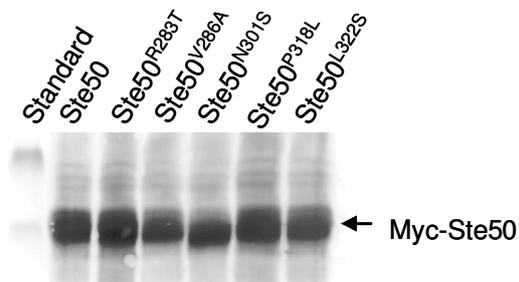
Die MAPK Signalwege sind für eine Vielzahl von Vorgängen in der *Saccharomyces cerevisiae* Zelle unerlässlich. Es besteht eine essentielle Beteiligung an der Induktion der Paarung, dem Filamentösen-Wachstumsweg und dem Hochosmolaren Antwortweg. An diesen drei Signalwegen ist das regulatorische Adaptorprotein Ste50 beteiligt.

Für das Protein Ste50 wurden bisher zwei getrennte Interaktionsdomänen (die RA Domäne und die SAM Domäne) anhand von Sequenzhomologien definiert und beschrieben. Die SAM Domäne befindet sich am N-Terminus von Ste50 und ist notwendig um die Interaktion mit der MAPKKK Ste11 zu vermitteln. Die Ras-Associated (RA) Domain wird als essentiell beschrieben, jedoch konnten bisher weder die Struktur noch alle Interaktionspartner vollständig geklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die RA Domäne die Interaktion mit den kleinen G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 vermittelt (Spode, 2003; Hopp, 2005, Tatebayashi *et al.*, 2006). Ein weiterer Interaktionspartner von Ste50 ist das kleine Membranprotein Opy2 (Wu *et al.*, 2006). Auch hierbei könnte die RA- Domäne für die Vermittlung der Interaktion eine Rolle spielen.

Um die RA Domäne von Ste50 genauer zu untersuchen, sollten mittels PCR-Mutagenese essentielle Aminosäuren für die Funktion und die Interaktion mit anderen Proteinen identifiziert und beschrieben werden. Neben der Untersuchung zur Interaktion wurde zuerst eine phänotypische Analyse der Ste50 Mutanten in den drei Signalwegen, der Pheromonantwort, dem HOG-Signalweg und dem filamentösen Wachstum, an denen Ste50 beteiligt ist, durchgeführt.

Durch Random-PCR-Mutagenese in dem RA-Domänen Bereich von Ste50 wurden Mutanten erzeugt. Einige dieser Mutanten zeigten einen Wachstumsdefekt auf hochosmolarem Medium (*ste50-RA2*; *ste50-RA20*; *ste50-RA64*) (Spode, 2003). Eine Sequenzierung der DNA-Sequenz hatte ergeben, dass es sich bei diesen Mutanten um open reading frames (ORF) mit der vollen Länge handelt, die jedoch eine zweifache Punktmutation in der DNA Sequenz enthalten. Es war daher nötig, diese doppelten Mutationen zu vereinzeln, um die Rolle der jeweils ausgetauschten Aminosäure zu untersuchen. Hierfür wurde mittels PCR die mutierte Sequenz mit der wildtypischen *STE50* Sequenz ersetzt und so fünf Einzelmutanten erzeugt. Die Mutante *ste50-RA2* wurde so in die Mutanten *ste50*<sup>V286A</sup> und *ste50*<sup>P318L</sup> getrennt. Ebenso konnten die Mutanten *ste50*<sup>R283T</sup> und *ste50*<sup>L322S</sup> aus *ste50-RA64* isoliert werden. Die Mutante *ste50-*

RA20 mit den Mutationen R296G und N301S konnte nur einmal vereinzelt werden, da das verwendete Primerpaar mit 18 bp Länge die Mutation an Position 886 (R296G) überdeckte. Es konnte daher nur die Einzelmutante Ste50<sup>N301S</sup> erzeugt werden. Die Mutanten wurden in den Vektor pGREG526 hinter einen *GAL1*-Promotor kloniert. Um eine erfolgreiche Klonierung nachzuweisen, wurde die Expression der Mutanten überprüft. Hierfür wurden sie in den Hefestamm HCH100 ( $\Delta ste50 \Delta ssk1$ ) transformiert und die Expression mit Galaktose induziert. Die Expression von der Ste50-Mutanten wurde mit SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse überprüft. In Abbildung 3.1 wird die Western-Blot-Analyse der Mutanten gezeigt. Alle Ste50 Mutanten zeigen ein ähnliches Laufverhalten im SDS Gel wie das wildtypische Ste50.



### Abbildung 3.1 Expressionsnachweis der Ste50 Mutanten

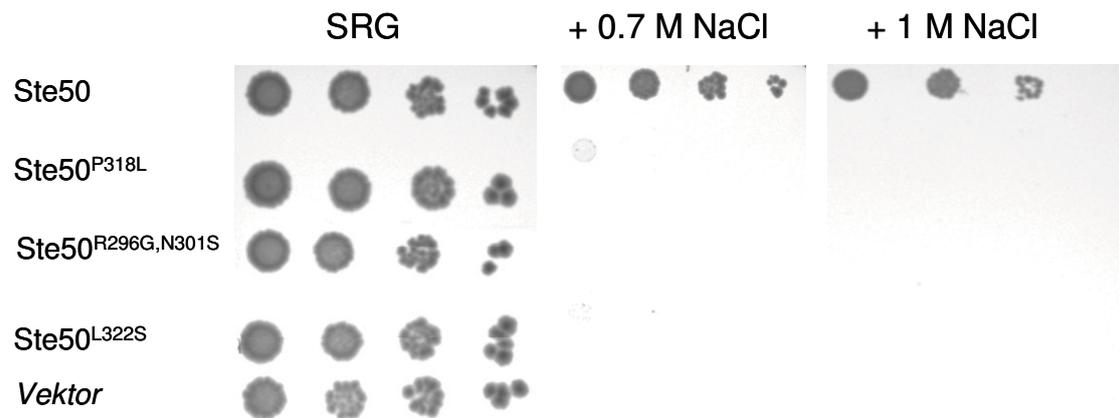
Ein  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Stamm wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Die Transformanten wurden in induzierendem SRG Medium angezogen. Die Zellen wurden geerntet und aufgeschossen. Die Rohextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse mit anti-Myc Antikörper wurde durchgeführt. Stamm: W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  (HCH100) Plasmide: Ste50 pGREG526STE50 (ENB156); Ste50<sup>R283T</sup> pGREG526STE50<sup>R283T</sup> (ENB19); Ste50<sup>V286A</sup> pGREG526STE50<sup>V286A</sup> (ENB13); Ste50<sup>N301S</sup> pGREG526STE50<sup>N301S</sup> (ENB17); Ste50<sup>P318L</sup> pGREG526STE50<sup>P318L</sup> (ENB15); Ste50<sup>L322S</sup> pGREG526 STE50<sup>L322S</sup> (ENB21)

### 3.1.1 Auswirkung der RA- Mutanten auf den Hochosmolaren Antwortweg

Der Hochosmolare Antwortweg bietet die Möglichkeit die Funktionalität der RA-Mutanten mittels eines Wachstumstests zu überprüfen. Um den HOG-Signalweg auszuschalten, muss sowohl der Sho1 Weg als auch der parallel verlaufende Sln1 Weg unterbrochen sein. Zellen in denen beide Wege unterbrochen sind, können nicht auf hochosmolarem Medium wachsen. Wird einer der beiden Wege wieder hergestellt, ist ein Wachstum der Zellen unter hochosmolaren Bedingungen möglich. In dem  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Stamm sind beide Signalwege unterbrochen. In diesen Stamm wurden die erstellten Mutanten transformiert und auf das Wachstum unter Salzstress getestet. Die ursprünglichen Doppelmutanten zeigen alle ein Wachstumsdefizit unter Salzstress (Spode, 2003). Die Mutanten  $ste50^{P318L}$  und  $ste50^{L322S}$  zeigen ein Wachstumsdefizit unter hochosmolaren Bedingungen bei einer NaCl Konzentration von 0,7 M und 1,0 M (Tabelle 3.1 und Abbildung 3.2). Die Mutanten  $ste50^{R283T}$ ,  $ste50^{V286A}$  und  $ste50^{N301S}$  zeigen eine volle Komplimentierung des Wachstumsdefizits einer  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Deletionsmutante (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3-1 Übersicht über die Auswirkungen von RA-Mutationen auf die Funktion von STE50 im HOG-Signalweg**

Name	Mutation		Test auf Osmostress
	Basen-Austausch	Aminosäure-Austausch	
<i>STE50</i>			+
<i>ste50-RA2</i>	857, 953	V286A; P318L	-
<i>ste50-RA20</i>	886, 902	R296G; N301S	-
<i>ste50-RA64</i>	848, 965	R283T; L322S	-
<i>ste50<sup>R283T</sup></i>	848	R283T	+
<i>ste50<sup>V286A</sup></i>	857	V286A	+
<i>ste50<sup>R296G</sup></i>	886	R296G	-(*)
<i>ste50<sup>N301S</sup></i>	902	N301S	+
<i>ste50<sup>P318L</sup></i>	953	P318L	-
<i>ste50<sup>L322S</sup></i>	965	L322S	-
* Die Mutante <i>ste50<sup>R296G</sup></i> wurde nicht isoliert			



**Abbildung 3.2 Osmosensitivität der *ste50*-RA Mutanten gegenüber NaCl unter Überexpressionsbedingungen**

Gezeigt ist das Wachstum des Doppeldeletionsstammes W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  nach 3-5 Tagen. Der Stamm wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Für die Dokumentation des Wachstums auf hochosmolarem Medium wurden die Transformanten in SRG Medium logarithmisch angezogen und 0,4 OD<sub>600</sub> -Einheiten geerntet. Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen und serielle 10-fach Verdünnungen hergestellt. Es wurden jeweils 3,5  $\mu$ l jeder Verdünnung, absteigend von links nach rechts verlaufend, aufgetropft. Das Wachstum wurde nach 3 d (SRG) und 5 d (0,7 M; 1,0 M) festgehalten.

Stamm: W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  (HCH100) Plasmide: Ste50 pGREG526STE50 (ENB156); Ste50<sup>P318L</sup> pGREG526STE50<sup>P318L</sup> (ENB15); Ste50<sup>R296G,N301S</sup> pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N301S</sup> (ELS465); Ste50<sup>L322S</sup> pGREG526STE50<sup>L322S</sup> (ENB 21); Vektor pGREG526 (EWK75)

Da die Mutante Ste50<sup>N301S</sup> keinen Phänotypen unter hochosmolaren Bedingungen zeigt, wurde für alle weiteren Versuche wieder die Doppelmutante *ste50-RA20* verwendet, in der Annahme, dass die Mutation R296G für den beobachteten Funktionsverlust im HOG Weg verantwortlich ist. Als Negativkontrolle wurde der Stamm  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  mit einem pGREG Leervektor transformiert. Auch hier ist kein Wachstum unter Salzstress zu beobachten (Abbildung 3.2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es drei Punktmutationen innerhalb der RA-Domäne gibt, die zu einem vollständigen Funktionsverlust im hochosmolaren Antwortweg führen.

### 3.1.2 Auswirkung der RA-Mutanten auf den Pheromon-Antwortweg

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation in der RA-Domäne von Ste50 in einem kompletten Funktionsverlust im HOG Weg resultiert. Daher soll untersucht werden, welchen Einfluss Punktmutationen in der RA-Domäne von Ste50 auf die Signalweiterleitung im Pheromon-Antwortweg haben. Die Deletion der RA-

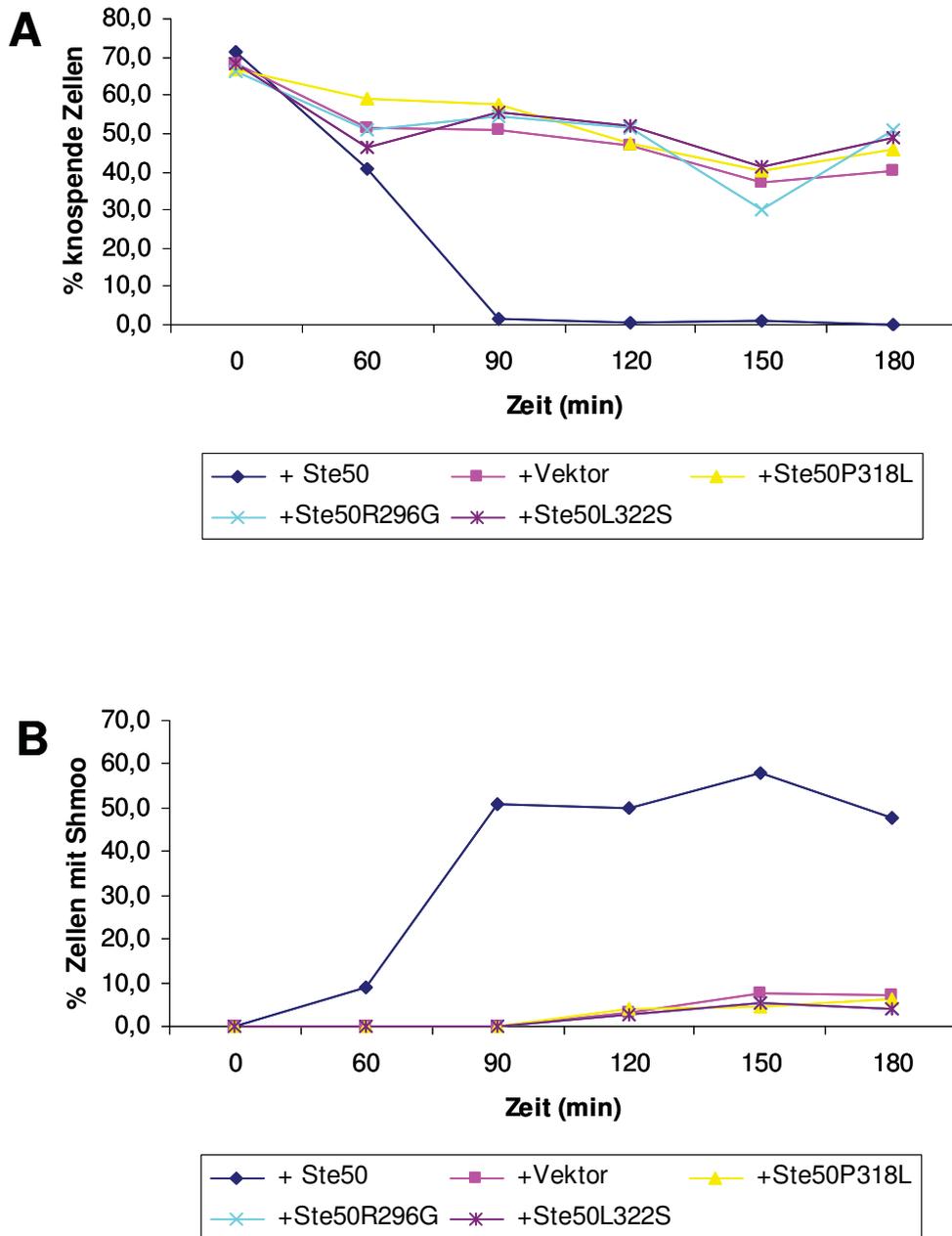
Domäne von Ste50 führt, ebenso wie eine Deletion des kompletten Gens, zu einer verminderten Sensibilität gegenüber Paarungspheromon und einer beinahe vollständigen Sterilität der Zelle (Ramezani-Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996). Hier soll untersucht werden, welche Auswirkungen die drei Punktmutationen auf die Veränderung der Morphologie nach  $\alpha$ -Faktor Induktion, den G1-Zellzyklus-Arrest und die Induktion eines *lacZ*-Reporterkonstrukts mit *FUS1* Promotor haben.

### 3.1.2.1 Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen der Zelle und dem G1-Zellzyklus-Arrest nach Behandlung mit $\alpha$ -Faktor

Haploide Hefezellen besitzen die Fähigkeit mit Zellen des anderen Paarungstyps zu paaren und diploide Hefezellen zu bilden. Die über den MAPK Signalweges vermittelte Erkennung des Paarungspheromons führt zu starken Veränderungen im vegetativen Wachstum der Zellen. Die Zellen arretieren in der G1-Phase des Zellzyklus und bilden einen Paarungsfortsatz (Shmoo) aus. Die Stärke dieser Antwort ist in direkter Abhängigkeit zur Stärke des Signals. Eine Deletion von *STE50* führt zu einer verminderten Pheromonsensitivität, was sich in einer Verminderung des G1-Arrests und der fehlenden Ausbildung von Shmoos zeigt. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine *STE50*- $\Delta$ RA Mutante im Pheromonantwortweg nicht aktiv ist (Wu *et al.*, 1996). Die untersuchten Ste50 Mutanten sind nicht funktionsfähig im HOG-Signalweg, es galt zu testen, ob sie auch im Pheromonantwortweg nicht funktionell sind.

Es ist möglich diese Veränderungen durch künstliche Zugabe von  $\alpha$ -Faktor zu Zellen des Matingstyps a hervorzurufen. Hierfür wurde der Stamm W303-1A  $\Delta$ *ste50* mit den Plasmiden pGREG526, pRS416-GALp-Ste50, pGREG526STE50<sup>P318L</sup>, pGREG526STE50<sup>L322S</sup>, pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> transformiert. Die Transformanten wurden in galaktosehaltigem Medium logarithmisch angezogen und mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. An den Zeitpunkten 0, 60, 90, 120 und 150 Minuten wurden Proben entnommen und die Zellen fixiert. Die Proben wurden anschließend nach drei Kriterien ausgezählt: Zellen im G1-Arrest - also Zellen ohne Knospe, Zellen mit Knospe und Zellen mit Shmoo. Es wurden mindestens 200 Zellen zufällig ausgezählt.

In Abbildung 3.3 ist das Ergebnis der Auswertung zu sehen. Bei logarithmisch wachsenden Zellen liegen knapp 2/3 dieser als knospende Zellen vor. Dies ist sowohl bei dem Wildtyp als auch bei den Ste50 Mutanten zu beobachten. Nach Zugabe des Paarungspheromons sinkt die Anzahl der knospenden Zellen bei Ste50 Zellen innerhalb von 90 Minuten auf 0 herab und bleibt auf diesem Niveau bis zum Ende der Messung. Bei den drei zu testenden Mutanten sinkt die Anzahl der knospenden Zellen innerhalb von



**Abbildung 3.3 Auswirkung der Ste50-RA Mutanten auf morphologische Veränderungen und G1-Arrest nach Zugabe von Paarungspheromon**

Der Stamm W303-1A  $\Delta ste50$  wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Die Transformanten wurden in flüssigen Minimalmedium mit Galaktose angezogen, um die Expression zu induzieren. Die Transformanten wurden aus einer Übernachtskultur in frischen Medium angeimpft und zu einer logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann wurde  $\alpha$ -Faktor zu einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M zugegeben. Es wurden Proben entnommen und die Zellen fixiert. Die Anzahl der knospenden Tellen (Budding-Index) (**A**) und Shmoo bildende Zellen (Shmoo-Index) (**B**) wurden mikroskopisch bestimmt. Die Werte werden in % der gesamten Zellzahl angegeben. Stamm: WAM4 (HFB93); Plasmide: Ste50 pRS416-STE50 (ELS164); Vektor pGREG546 (EWK83); Ste50<sup>P318L</sup> pGREG526STE50<sup>P318L</sup> (ENB15); pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> (ELS465), Ste50<sup>L322S</sup> pGREG526STE50<sup>L322S</sup> (ENB21)

150 Minuten auf 40 bis 50% herab. Damit liegen sie auf dem gleichen Niveau wie der  $\Delta ste50$  Stamm, der als Negativkontrolle verwendet wurde. Ein Einfluss der Mutanten auf das vegetative Wachstum kann nicht festgestellt werden. So ist die Anzahl der knospenden Zellen am Zeitpunkt 0 Min gegenüber den Kontrollen nicht verändert.

Nachdem die Zellen in G1 Arrest sind, bilden sie Paarungsfortsätze aus. Bei Zellen mit wildtypischen Ste50 haben nach 90 Minuten 52% der Zellen einen oder mehrere Shmoo ausgebildet. Die Anzahl von Shmoo bildenden Zellen steigt nach 150 Minuten auf bis 60% an und beginnt ab diesem Zeitpunkt wieder zu sinken. Sowohl bei den drei Mutanten, als auch bei dem  $\Delta ste50$  Stamm bildet nur 3-8 % der Zellen Paarungsfortsätze aus. Nach 150 Minuten nimmt auch bei diesen Stämmen die Zahl der shmoo bildenden Zellen wieder ab. Die Zellen haben sich an die Präsenz des  $\alpha$ -Faktors adaptiert und beginnen wieder mit dem vegetativen Wachstum.

Die drei untersuchten *STE50* Mutanten zeigen eine geringe Pheromonsensitivität - wie sie auch bei einer *STE50* Deletion zu beobachten ist. Die Mutanten sind daher in der Pheromonantwort defekt.

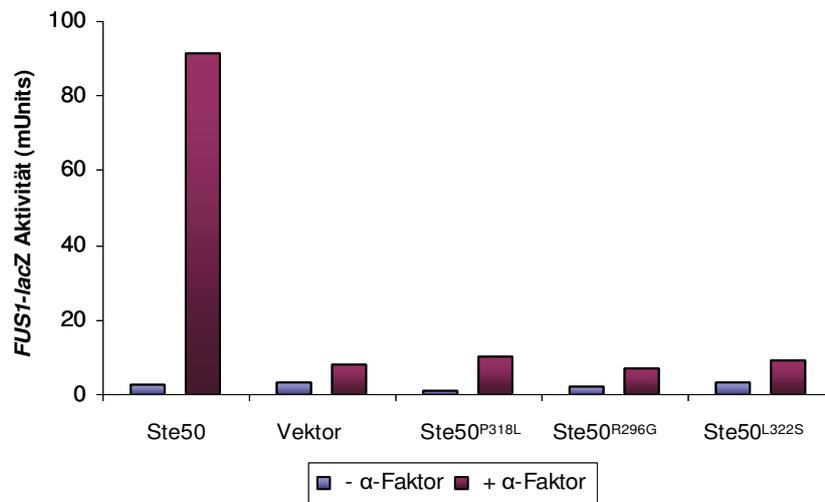
### **3.1.1.1 Untersuchung zum Einfluss der Ste50 Mutanten auf die Expression des Reportergens *FUS1-lacZ***

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass Ste50 eine wichtige Rolle in dem Pheromon-Antwortweg spielt. Die Mutanten der RA-Domäne von Ste50 verhalten sich während der Untersuchungen zur Pheromonsensitivität wie eine  $\Delta ste50$  Mutante.

Um diesen beobachteten Phänotypen zu überprüfen und weiter auszuarbeiten, soll nun die Expression eines *lacZ* Reporterkonstruktes mit dem *FUS1* Promotor untersucht werden. *FUS1* ist ein wichtiges Zielgen der pheromonvermittelten MAPK-Kaskade, welches für die Fusion der Zellen während der Paarung benötigt wird (Truehard & Fink, 1989)

Hierfür wurden die Zellen des Stammes W303-1A  $\Delta ste50$  mit dem Reporter gen *FUS1-lacZ* und den Plasmiden pGREG526, pRS416-GALp-Ste50, pGREG526STE50P<sup>318L</sup>, pGREG526STE50<sup>L322S</sup>, pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> transformiert. Die Zellen wurden logarithmisch angezogen und mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor behandelt und nach 90 Minuten geerntet. Es wurden Rohextrakte hergestellt und die Transformanden hinsichtlich ihrer  $\beta$ -Galaktosidase Reporteraktivität untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

Zellen ohne  $\alpha$ -Faktor Behandlung zeigen nur eine sehr geringe Eigenaktivität von 2-5 mUnits (basales Level) des *FUS1-lacZ* Reportergens. Weder die Deletion von *STE50* noch die Expression der RA Mutanten beeinflusst das basale Level der *FUS1-lacZ* Expression.



### Abbildung 3.4 Auswirkung der Ste50-RA Mutanten auf die *FUS1-lacZ* Expression nach Zugabe von Paarungspheromon

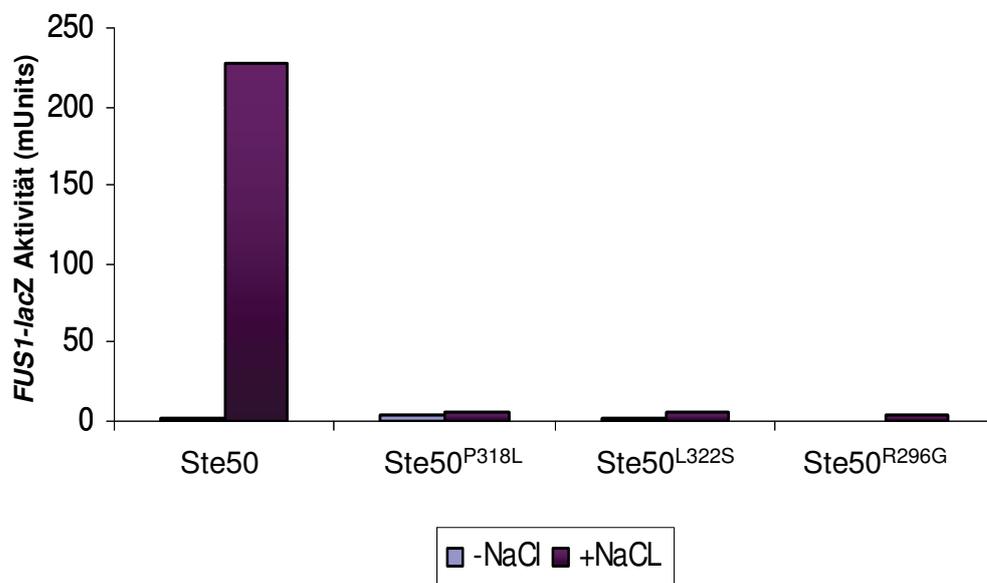
Die angegebenen Stämme wurden in flüssigen Minimalmedium angezogen. Die Zellen wurden aus einer Übernachtskultur in frischen Medium angeimpft und zu einer logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann wurde  $\alpha$ -Faktor zu einer Endkonzentration von 5  $\mu$ M zugegeben. Es wurden Proben entnommen und Rohextrakte hergestellt. Die Rohextrakte wurden zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktoasidase Aktivität benutzt. Die spezifische Aktivität wurde mittels der gesamten Proteinmenge bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte zweier unabhängiger Versuche (Abweichung innerhalb von  $\pm$  10%) Stamm: WAM4 (HFB93); Plasmide: Ste50 pRS416-STE50 (ELS164); Vektor pGREG546 (EWK83); Ste50<sup>P318L</sup> pGREG526STE50<sup>P318L</sup> (ENB15); Ste50<sup>R296G</sup> pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> (ELS465); Ste50<sup>L322S</sup> pGREG526-STE50<sup>L322S</sup> (ENB21); *FUS1-lacZ* pMG10 (EFB13)

Wildtyp *STE50* (ELS164) wurde als Positivkontrolle verwendet. Es wird gezeigt, dass dies zu einer starken *lacZ* Expression von 92 mUnits nach  $\alpha$ -Faktor Behandlung führt (Abbildung 3.4). Die getesteten Mutanten zeigen eine um den Faktor 10 niedrigere *lacZ* Aktivität nach Induktion durch  $\alpha$ -Faktor. Die Aktivität befindet sich auf dem Level, das auch eine mit  $\alpha$ -Faktor behandelte *STE50* Deletion zeigt. *STE50* Deletionsstämme weisen eine deutlich verringerte Aktivierung von *FUS1-lacZ* Expression auf (Ramezani Rad, 1992; Xu et al., 1996).

Somit bewirkt die Expression der RA-Mutanten nach Behandlung mit  $\alpha$ -Faktor keine Erhöhung der *FUS1-lacZ* Expression über ein Level einer *STE50* Deletion. Hingegen führt eine Überexpression von Ste50 zu einer starken Expression des Reportergens nach  $\alpha$ -Faktor Behandlung. Die Punktmutationen führen zu einem Defekt in dem Pheromon-Antwortweg.

### 3.1.2 Auswirkung der RA-Mutanten auf den Crosstalk zwischen HOG-Signalweg und dem Pheromon-Antwortweg

Die MAPK-Signalwege, die die Antwort auf osmolaren Stress und im Signalweg zur Induktion der Paarung weiterleiten, teilen sich einige Komponenten - darunter Ste50, Ste11 und Ste20. Es ist daher sehr wichtig für die Zelle die Signalspezifität aufrecht zu erhalten. Wird das Gen *HOG1* für die MAP Kinase deletiert, löst ein osmotischer Stress nicht mehr die Osmostress Antwort aus, sondern es kommt zum Crosstalk mit den



**Abbildung 3.5 Einfluss der Ste50-RA Mutanten auf den Crosstalk zwischen HOG-Weg und Pheromonantwort**

Der Stamm W303  $\Delta ste50 \Delta ssk1 \Delta hog1$  wurde mit einem FUS1-lacZ Plasmid und den Plasmiden pRS416-STE50, pGREG526-STE50P318L, pGREG546-STE50R296G und pGREG526-STE50L322S co-transformiert. Die Transformanten wurden in einer logarithmischen Kultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 angezogen, dann wurde NaCl zu einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben. Die Zellen wurden nach 8h geerntet. Die Rohextrakte wurden zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktoasidase Aktivität genutzt. Die spezifische Aktivität wurde mittels der Gesamtproteinmenge bestimmt. Die Angaben sind Mittelwerte basierend auf einer Doppelbestimmung. Stamm: W303-1A  $\Delta ste50 \Delta hog1$  (HCH286) Plasmide: Ste50 pRS416-GALp-STE50 (ELS164); Ste50<sup>P318L</sup> pGREG526-STE50<sup>P318L</sup> (ENB15); Ste50<sup>L322S</sup> pGREG526-STE50<sup>L322S</sup> (ENB21); Ste50<sup>R296G</sup> pRS416-STE50<sup>R296G</sup> (ELS465); FUS1-lacZ pMG10 (EFB13)

anderen Signalwegen (O'Rourke & Herskowitz, 1998). Die Zellen verhalten sich als wäre Paarungspheromon vorhanden und bilden Shmoo aus. Wird *STE50* neben *HOG1* deletiert, resultiert dies in einer Störung der Signalweiterleitung, und der Crosstalk wird unterbunden. Es soll nun überprüft werden, ob der Funktionsverlust der Mutanten im HOG-Signalweg und im Pheromon-Antwortweg auch auf den Crosstalk zutrifft.

Hierfür wurden die Plasmide pRS416-GALp-Ste50, pGREG526-STE50<sup>P318L</sup>, pGREG526-STE50<sup>L322S</sup>, pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> und das Reporter gen *FUS1-lacZ* in den

Stamm W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1 \Delta hog1$  transformiert. Die Transformanden wurden in Galaktose-Medium logarithmisch angezogen und dann für 8 Stunden mit 0,4 M NaCl behandelt, um die Expression von *FUS1-lacZ* zu induzieren. Die Zellen wurden anschließend geerntet und aufgeschlossen. Die Rohextrakte wurden dazu verwendet die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität analytisch zu bestimmen.

Es zeigt sich hierbei, dass die Expression von Wildtyp Ste50 einen ausgeprägten Crosstalk ermöglicht. Ohne Salz gibt es nur ein basales Level an *FUS1-lacZ* Expression (Abbildung 3.5). Die Zugabe von Salz führt zu einer starken Expression des für die Paarung wichtigen Gens *FUS1*. Die in der hochosmolaren Antwort nicht funktionstüchtigen Mutanten zeigen keine Aktivität im Crosstalk. Das Aktivitätslevel von *FUS1-lacZ* nach Salzbehandlung ist auch nach 8 Stunden nicht von dem nicht induzierten Level zu unterscheiden. Dies trifft für alle drei überprüften Mutanten zu (Abbildung 3.5). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der durch wildtypisches Ste50 vermittelte Crosstalk durch eine *STE50* Deletion unterbrochen wird. Eine Expression der Ste50-RA Mutanten kann den Crosstalk nicht wiederherstellen. Die Mutanten sind nicht funktional in der Weiterleitung des Ste50-MAPK-Signalwegs.

### 3.1.3 Auswirkung der RA-Mutanten auf den filamentösen Wachstumsweg

Der filamentöse Wachstumsweg kontrolliert in Diploiden die Bildung von Pseudohyphen und in Haploiden die Adhäsion und das invasive Wachstum. Beide Mechanismen sind miteinander verwandt, werden jedoch von unterschiedlichen Signalen ausgelöst. Wird die MAPK Signalkaskade unterbrochen, so verlieren die Zellen die Fähigkeit invasiv zu wachsen. Das Adaptorprotein Ste50 ist in diesem Weg aktiv und ein Verlust dessen, führt zu einer deutlichen Abschwächung des Signals (Jansen *et al.*, 2001).

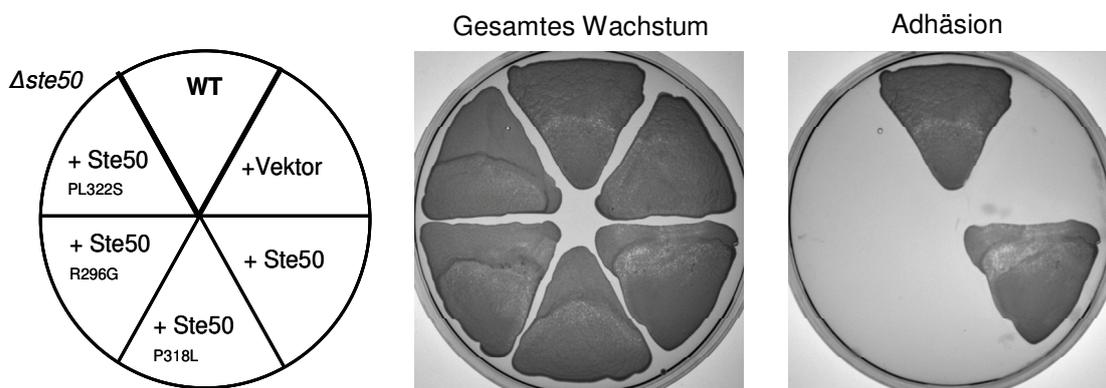
#### 3.1.3.1 Invasives Wachstum auf festem Medium

Haploide Hefestämme können auf festem Medium adhäsiv und invasiv wachsen. Das heißt, sie können an den Agar binden und sogar eindringen (Roberts & Fink 1994). Hierfür ist ein vollständiger MAPK Signalweg nötig, an dem auch das Protein Ste50 beteiligt ist. In vorhergegangenen Experimenten wurde nachgewiesen, dass die RA-Mutanten ihre Funktion im HOG Signalweg und in der Antwort auf Paarungspheromon verloren haben. Es gilt nun festzustellen, ob dieser Funktionsverlust auch für den invasiven Wachstumsweg zutrifft.

Um dies zu überprüfen wurden die Plasmide pGREG526, pRS416-GALp-Ste50, pGREG526-STE50<sup>P318L</sup>, pGREG526-STE50<sup>L322S</sup>, pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> in

einen haploiden  $\Delta ste50$  Stamm transformiert. Ein Wildtypstamm wurde als weitere Positivkontrolle verwendet, da dieser Adhäsion zeigt. Die Transformanden wurden von einer stationären Kultur mit  $OD_{600nm} = 10$  auf eine galaktosehaltige Platte ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend bei 30°C für 6 Tage inkubiert. Das Gesamtwachstum der Zellen wurde photographisch dokumentiert. Nachdem die Platten vorsichtig mit  $H_2O$  gewaschen wurden, um nicht adhäsiv gewachsene Zellen abzulösen, wurde das adhäsive Wachstum festgehalten.

Es ist zu sehen, dass alle untersuchten Stämme ein gleichmäßiges gesamtes Wachstum zeigen (Abbildung 3.6). Die Überexpression von Wildtyp Ste50 und der drei RA-Mutanten zeigt keinen Einfluss auf das vegetative Wachstum. Der Wildtypstamm zeigt adhäsives Wachstum nach 6 Tagen Inkubation. Als einziger weiterer Transformand zeigt die Expression von Wildtyp Ste50 adhäsives Wachstum (Abbildung 3.6). Eine Deletion von *STE50* führt zu einem Verlust der Fähigkeit zu invasivem Wachstum. Die drei RA-Mutanten können diesen Phänotypen nicht komplementieren und zeigen auf der Platte ebenfalls kein invasives Wachstum.



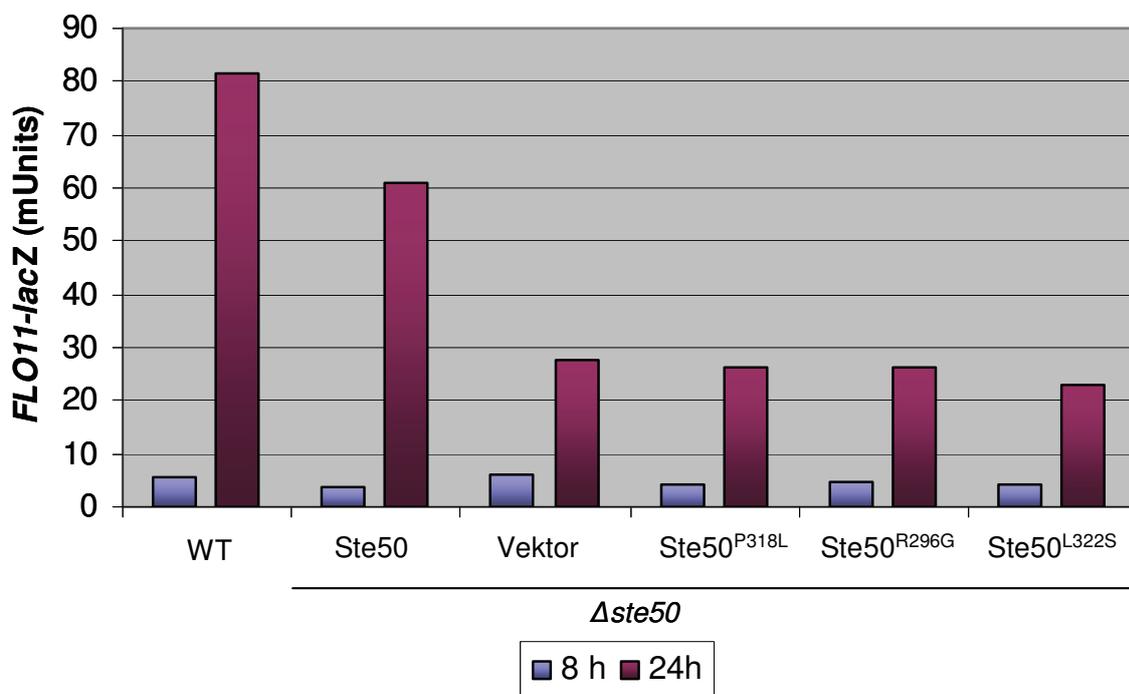
### Abbildung 3.6 Auswirkung der Ste50-RA Mutanten auf das invasive Wachstum von haploiden Zellen

Der Stamm  $\Delta ste50$  wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Die Transformanden wurden in galaktosehaltigem Medium angezogen und von einer Übernachtskultur auf eine SRG Platte ausgestrichen. Die Platte wurde für sechs Tage inkubiert und das Gesamtwachstum festgehalten. Dann wurden nicht invasiv wachsende Zellen sorgfältig abgewaschen und das Wachstum wiederum dokumentiert. Stämme: WT (*MATa* MR12-A; HFB750);  $\Delta ste50$  (FY753); Plasmide: Ste50 pRS416-STE50 (ELS164); Vektor pGREG546 (EWK83); Ste50<sup>P318L</sup> pGREG526-STE50<sup>P318L</sup> (ENB15); Ste50<sup>R296G,N310S</sup> pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> (ELS465); Ste50<sup>L322S</sup> pGREG526-STE50<sup>L322S</sup> (ENB21)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RA-Mutanten im invasiven Wachstum keine Aktivität zeigen, während die Überexpression von Ste50 den invasiven Wachstumsdefekt einer *STE50* Deletion komplementieren kann.

### 3.1.3.2 Expression von *FLO11-lacZ*

Die Induktion von invasivem Wachstum führt zur Aktivierung der Transkription einer Vielzahl von Genen. Ein wichtiges Gen für das invasive Wachstum und die Adhäsion ist *FLO11*. Die Expression von Flo11 wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Auch der MAPK Signalweg induziert die Expression von Flo11. Es soll nun mittels eines *FLO11-lacZ* Reportergens getestet werden, ob die Ste50 RA-Mutanten eine Signalweiterleitung in der Induktion von invasivem Wachstum ermöglichen. Dies ist eine Möglichkeit, den im vorherigen Experiment beobachteten Phänotypen eines Funktionsverlusts durch Mutationen in der RA-Domäne von Ste50 biochemisch zu überprüfen. Hierfür wurden die Stämme in flüssigem SRG Medium angezogen und für 24 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach 24h wurden Proben entnommen und die Zellen aufgeschlossen. Die



#### Abbildung 3.7 Auswirkung der Ste50-RA Mutanten auf die *FLO11-LacZ* Expression

Der Stamm MR12  $\Delta ste50$  wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Die Transformanten wurden in flüssigen Minimalmedium mit Galaktose angezogen, um die Expression zu induzieren. Die Transformanten wurden bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert und Proben für eine *lacZ* Aktivitätsbestimmung an den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Zellen wurden geerntet und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in den Rohextrakten wurde bestimmt. Es wurde mittels der Gesamtmenge Protein die spezifische Aktivität berechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Messungen. (Abweichung innerhalb von +/- 10%) Stämme: WT (*MATa* MR12-A, HFB750),  $\Delta ste50$  (HHG 848); Plasmide: Ste50 pRS416-STE50 (ELS164); Vektor pGREG546 (EWK83); Ste50<sup>P318L</sup> pGREG526-STE50<sup>P318L</sup> (ENB15); Ste50<sup>R296G</sup> pRS416-GALp-GST-STE50<sup>R296G,N310S</sup> (ELS465), Ste50<sup>L322S</sup> pGREG526-STE50<sup>L322S</sup> (ENB21)

Rohextrakte wurden auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

Es ist zu sehen, dass im Wildtyp Stamm die Expression des Reportergens *FLO11-lacZ* nach 24 Stunden aktiv ist (Abbildung 3.7), während in logarithmisch wachsenden Zellen nur eine basale Aktivität zu messen ist. Das Level der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität steigt von 8h zu 24h um den Faktor 14. Zellen die die primäre Kohlenstoffquelle Glukose verbraucht haben, aktivieren den filamentösen Wachstumsweg. Dies führt zu einer erhöhten Expression von *FLO11*. Bei dem  $\Delta ste50$  Stamm der mit einem Leervektor als Negativkontrolle transformiert wurde, zeigt sich eine Erhöhung der *FLO11-lacZ* Reporteraktivität nach 24 Stunden auf ein Drittel des Wildtypwertes. Eine Expression von *Ste50* in diesem Stamm führt zu einer teilweisen Komplementierung des Aktivitätsverlustes, der durch die Deletion von *STE50* im invasiven Wachstumsweg ausgelöst wurde. So zeigt sich hier eine Aktivität von 66% im Vergleich zum Wildtyp nach 24h. Dies lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass das Gen plasmidkodiert ist und daher nicht in allen Zellen exprimiert wird. Die drei Mutanten haben keinen Einfluss auf die Aktivierung des *FLO11-lacZ* Reportergens. So zeigt sich für die drei *STE50* Mutanten *ste50<sup>P318L</sup>*, *ste50<sup>L322S</sup>*, *ste50<sup>R296G,N310S</sup>* eine Expression des *FLO11-lacZ* Reportergens auf dem Level der *STE50* Deletion. Es gibt keine Komplementierung der *STE50* Deletion durch die Mutanten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch im Flüssigmedium die Induktion von *FLO11-lacZ* sehr stark ausgelöst werden kann. Hierfür ist ein funktionierender MAPK-Signalweg mit *Ste50* notwendig. Die Expression von RA-Mutanten hat keinen Einfluss auf die Expression des *FLO11-lacZ* Reportergens. Das Level bleibt auf dem Niveau einer *STE50* Deletion.

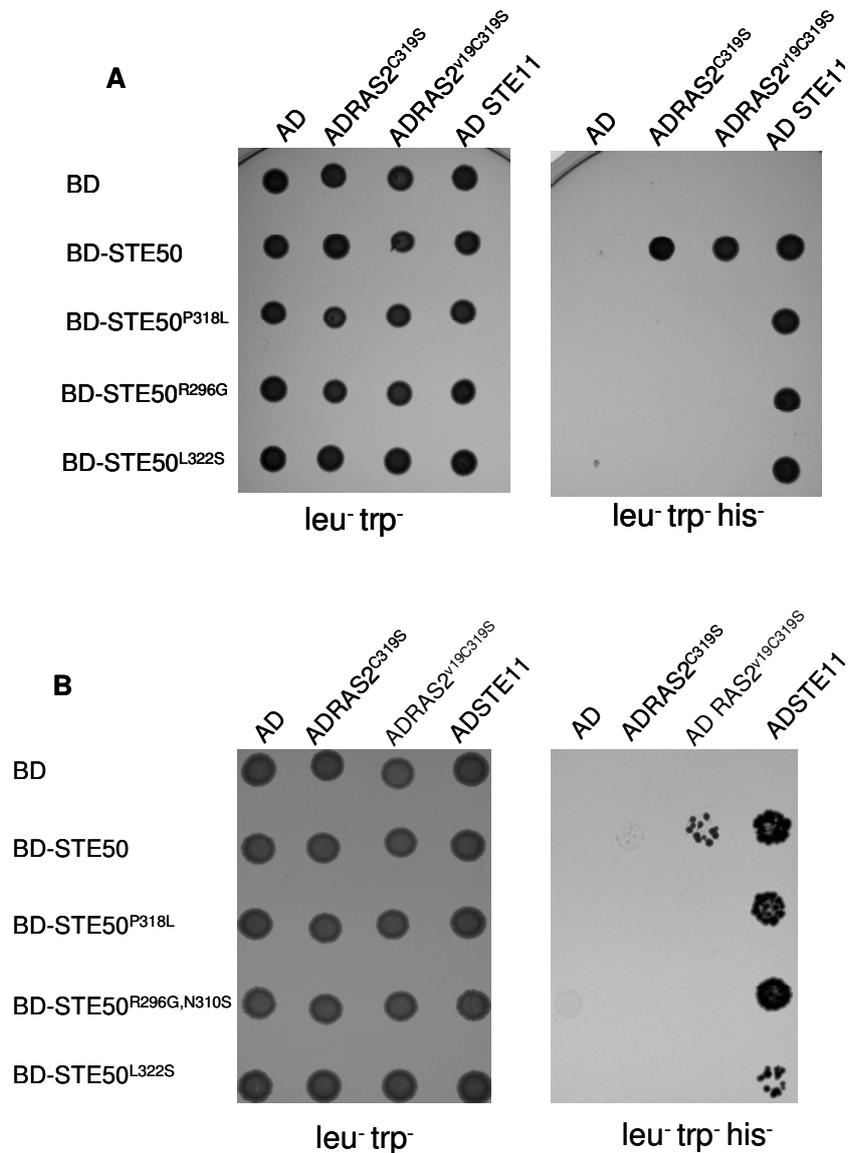
### 3.2 Analyse der RA-Domänen abhängigen Interaktionen von Ste50

Ste50 dient in der Hefe als regulatorischer Adaptor in drei MAPK Signalwegen. Diese Wege sind Osmotoleranz, Antwort auf Paarungspheromon und invasives Wachstum. Ste50 hat zwei distinkte Domänen, welche Interaktionen mit anderen Proteinen vermitteln können. Die SAM (steril alpha motif) Domäne vermittelt die Interaktion mit Ste11. Die Ste50-Ste11 Interaktion ist ausführlich charakterisiert. Ste50 assoziiert mit Ste11 und reguliert dessen Aktivität innerhalb der Phosphorylierungskaskade der Signalwege. Die zweite Domäne von Ste50 ist die Ras-associated (RA) Domäne, die eine Interaktion von Ste50 mit den kleinen G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 vermitteln kann (Hopp, 2005). Im Gegensatz zur Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 sind diese Interaktionen deutlich schwächer und wahrscheinlich transient. Ein weiteres Protein, das möglicherweise mit Ste50 über die RA-Domäne assoziiert, ist das kleine Transmembranprotein Opy2.

Opy2 ist in der Signalweiterleitung des HOG Signalweg involviert (Wu *et al.*, 2006). Es wurde als Interaktionspartner von Ste50 identifiziert, doch konnte bisher nicht geklärt werden, welcher Teil von Ste50 mit Opy2 interagiert. Der Bereich von Opy2, der mit Ste50 interagiert, wird als Ste50 Interaktion Domain bezeichnet (SID). Im folgenden Versuchsteil sollen das Interaktionsverhalten der RA-Mutanten mit den kleinen G-Proteinen mittels der Two-Hybrid Analyse untersucht werden. Desweiteren sollen die Interaktion zwischen Ste50 und Opy2 mittels Two-Hybrid analysiert werden.

#### 3.2.1 Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Ras2

Die im vorherigen Versuchsteil charakterisierten RA-Mutanten sollen nun auf ihre Interaktion mit den kleinen G-Proteinen untersucht werden. Die RA-Mutanten zeigten einen Wachstumsdefizit auf Salz in der Pheromonantwort und im invasiven Wachstum. Das Protein Ras2 spielt eine wichtige Rolle im invasiven Wachstum. Da bereits gezeigt wurde, dass Ste50 mit Ras2 interagiert (Hopp, 2005), soll nun mittels Two-Hybrid Analyse untersucht werden, ob die drei Mutanten Ste50<sup>P318L</sup>, Ste50<sup>R296G,N301S</sup> und Ste50<sup>L322S</sup> mit Ras2 interagieren. Die Two-Hybrid Methode wird als *in vivo* System zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen genutzt (Fields & Song, 1989). Hierbei wird ein Protein an die Aktivierungsdomäne von Gal4 fusioniert, während das andere Protein an die Bindedomäne fusioniert wird. Beide Fusionsproteine werden in einem speziellen



### Abbildung 3.8 Untersuchung der Interaktion von Ste50-RAS-Mutanten mit Ras2 mittels Two-Hybrid Analyse

Der Hefestamm PJ187 wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Für den Wachstumstest auf leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Medium wurden die Transformanten logarithmisch angezogen. Es wurden 0,4 OD<sub>600</sub> geerntet und in 100 µl (A) bzw. 1000 µl (B) H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es wurden 3,5 µl aufgetropft. Nach Inkubation der Platten für 2 Tage bei 30°C wurde das Wachstum auf SD leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Platten dokumentiert. Als Negativkontrolle dienen die Transformationen mit den Plasmiden pAD2 bzw. pMBD. Stamm: PJ187 ; Plasmide: AD (pAD2, EWK66); ADRAS2<sup>C318S</sup> (pAD-RAS2F, ECH167); ADRAS2<sup>V19C318S</sup> (pAD-RAS2val19F, ECH157); ADSTE11 (pAD-STE11, ELS243); BD (pMBD, EWK67); BDSTE50 (pMBD-STE50, ECH199); BD-STE50<sup>P318L</sup> (pMBD-STE50<sup>P318L</sup>, ECH191); BD-STE50<sup>R296G,N301S</sup> (pMBD-STE50<sup>R296G,N301S</sup>, ELS563); BD-STE50<sup>L322S</sup> (pMBD-STE50<sup>L322S</sup>, ECH192)

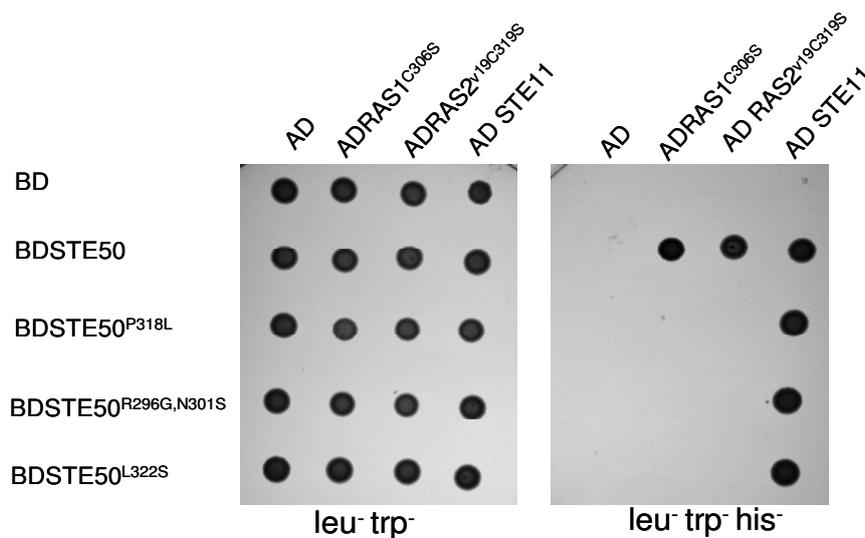
Reporterstamm co-exprimiert. Der Stamm PJ187 ist diploid und enthält die Reportergene *lacZ*, *HIS3* und *ADE2*. Die Intensität der Transkriptionsaktivierung dient als Maß für die Stärke der Wechselwirkung der Proteine. Als Reporter wurde das Wachstum auf Histidin- freiem Medium verwendet, da es sich gut eignet schwache Interaktion deutlich darzustellen. Da die Interaktion eines Two-Hybrid Versuches im Zellkern stattfindet und Ras2 ein plasmamembranassoziiertes Protein ist, musste mittels zielgerichteter Mutagenese das Cystein an Position 319 durch ein Serin ausgetauscht werden. Hierdurch wurde die CAAX-Box verändert und das posttranslationale Signal für Farnesylierung und Palmitoylierung zerstört. Die so veränderten Proteine werden nicht mehr an die Plasmamembran rekrutiert und können daher mit den möglichen Interaktionspartnern interagieren. Zudem wurde die hyperaktive Ras2 Mutante Ras2<sup>val19</sup> untersucht, welche verstärkt den Filamentösen-Wachstumsweg aktiviert (Mösch *et al.*, 1996).

Der Two-Hybrid-Stamm PJ187 wurde mit den verwendeten Plasmiden transformiert (Abbildung 3.8). Die Transformanden wurden auf leu-trp- Medium getropft - als Wachstumskontrolle - und als Test für die Interaktion diente Wachstum auf his-Medium. Leervektoren der Aktivierungsdomäne (AD) und der Bindedomäne (BD) wurden als Negativkontrolle verwendet. Die Interaktion von Ste50 mit Ste11, welche bereits mehrfach nachgewiesen wurde, diente als Positivkontrolle (Jansen *et al.*, 2001). Es zeigt sich, dass Ste50 mit Ras2 sowie mit Ras2<sup>val19</sup> interagiert. Tropft man die Zellen in hoher Konzentration auf Histidin- Platten, lässt sich kein Unterschied zwischen den beiden Formen von Ras2 erkennen. Tropft man hingegen weniger Zellen, so kann weiterhin ein Wachstum der Zellen beobachtet werden, wenn die Proteine Ste50 und Ras2<sup>val19</sup> co-exprimiert sind. Hingegen liegt kein Wachstum bei den Fusionsproteinen Ste50 und Ras2 vor (Abbildung 3.8 B). Die drei getesteten Mutanten (STE50<sup>P318L</sup>, STE50<sup>R296G,N301S</sup> und STE50<sup>L322S</sup>) zeigen eine Interaktion mit Ste11, die von der SAM Domäne vermittelt wird. Bei keiner der drei Mutanten zeigt sich eine Interaktion mit Ras2 oder Ras2<sup>val19</sup>, weder bei hoher Zellzahl, noch bei niedriger Zellzahl. Bei den Negativkontrollen ist kein Wachstum zu sehen (Abbildung 3.8).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ste50 stärker mit der hyperaktiven Mutante Ras2<sup>val19</sup> interagiert als mit Wildtyp Ras2. Die drei untersuchten RA-Mutanten zeigen keine Interaktion - weder mit Ras2 noch mit hyperaktivem Ras2<sup>val19</sup>.

### 3.2.2 Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Ras1

Das Protein Ras1 hat eine hohe Homologie zu Ras2. Ras1 spielt keine Rolle im invasiven Wachstum (Mösch *et al.*, 1999). Eine *RAS1* Deletion zeigt jedoch Einfluss auf die Paarung von Hefezellen (Bühning, Ramezani-Rad, unveröffentlichte Daten). Hinzu kommt auch, dass  $\Delta ras1$  und  $\Delta ras2$  Stämme Unterschiede in chronologischen Alterungsprozessen zeigen (Poplinski *et al.*, 2007). Es ist daher möglich, dass Ste50 unter bestimmten Umständen mit Ras1 interagiert. Es gilt nun zu überprüfen, ob die Ste50 Mutanten, die keine Aktivität im Paarungsweg zeigen, eine Interaktion mit Ras1 aufweisen. Ras1 wird wie Ras2 posttranslational durch eine Farnesylierung und eine Palmitoylierung modifiziert. Um eine Lokalisierung in den Zellkern zu ermöglichen, wurde die CAAX-Box mittels eines Austausches des Cystein an Position 306 zu Serin modifiziert. Neben der Interaktion Ste50-Ste11 als Positivkontrolle wurde die Interaktion



**Abbildung 3.9 Untersuchung der Interaktion von Ste50-RA-Mutanten mit Ras1 und Ras2 mittels Two-Hybrid Analyse**

Der Hefestamm PJ187 wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Für den Wachstumstest auf leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Medium wurden die Transformanten logarithmisch angezogen. Es wurden 0,4 OD<sub>600</sub> geerntet und in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es wurden 3,5 µl aufgetropft. Nach Inkubation der Platten für 2 Tage bei 30°C wurde das Wachstum auf SD leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Platten dokumentiert. Als Negativkontrolle dienten die Transformationen mit den Plasmiden pAD2 bzw. pMBD.

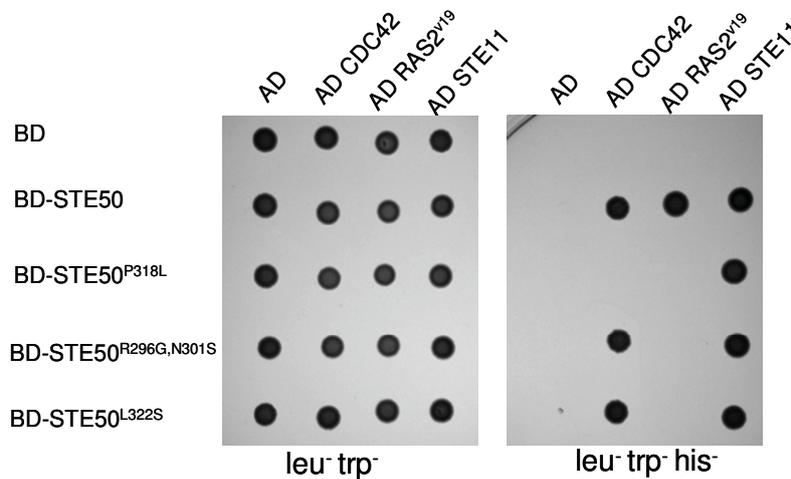
Stamm: PJ187; Plasmide: AD (pAD<sub>2</sub>, EWK66); ADRAS1<sup>C306S</sup> (AD-RAS1F, ECH163); ADRAS2<sup>V19C318S</sup> (pAD-RAS2val19F, ECH157); ADSTE11 (pAD-STE11, ELS243); BD (pMBD, EWK67); BDSTE50 (pMBD-STE50, ECH199); BDSTE50<sup>P318L</sup> (pMBD-STE50<sup>P318L</sup>, HCH191); BDSTE50<sup>R296G,N301S</sup> (pMBD-STE50<sup>R296G,N301S</sup>, ELS563); BDSTE50<sup>L322S</sup> (pMBD-STE50<sup>L322S</sup>, ECH192)

von Ste50 mit Ras2<sup>val19,C319S</sup> als Kontrolle für eine schwache Interaktion verwendet.

Es ist zu sehen, dass Ste50 mit Ras1 interagiert, da es Wachstum auf his- Medium gibt. Die Mutanten zeigen keine Interaktion mit Ras1 (Abbildung 3.9). Die Negativkontrollen mit BD und AD Leervektoren zeigen kein Wachstum.

### 3.2.3 Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Cdc42

Cdc42 ist wie Ste50 in dem Pheromon-Antwortweg, dem Filamentösen-Wachstumsweg und dem HOG-Signalweg involviert. Es wurde gezeigt, dass Cdc42 mit Ste50 interagiert



#### Abbildung 3.10 Untersuchung der Interaktion von Ste50-RA-Mutanten mit Cdc42 und Ras2 mittels Two-Hybrid Analyse

Der Hefestamm PJ187 wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Für den Wachstumstest auf leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Medium wurden die Transformanden logarithmisch angezogen. Es wurden 0,4 OD<sub>600nm</sub> geerntet und in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es wurden 3,5 µl aufgetropft. Nach Inkubation der Platten für 2 Tage bei 30°C wurde das Wachstum auf SD leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Platten dokumentiert. Als Negativkontrolle dienten die Transformationen mit den Plasmiden pAD2 bzw. pMBD.

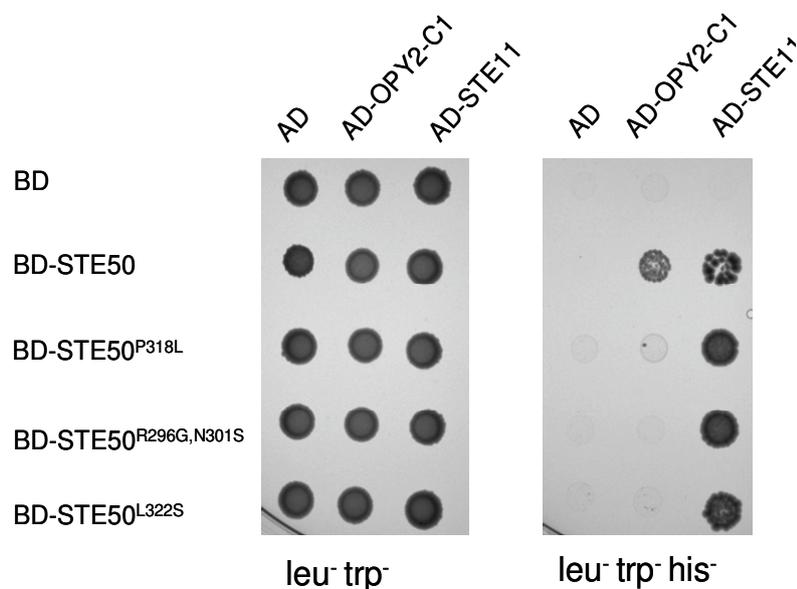
Stamm: PJ187; Plasmide: AD (pAD2, EWK66); ADCDC42 (pAD-CDC42, EFB67); ADRAS2<sup>v19C318S</sup> (pAD-RAS2<sup>val19F</sup>, ECH157); ADSTE11 (pAD-STE11, ELS243); BD (pMBD, EWK67); BDSTE50 (pMBD-STE50, ECH199); BDSTE50<sup>P318L</sup> (pMBD-STE50<sup>P318L</sup>, HCH191); BDSTE50<sup>R296G,N301S</sup> (pMBD-STE50<sup>R296G,N301S</sup>, ELS563); BDSTE50<sup>L322S</sup> (pMBD-STE50<sup>L322S</sup>, ECH192)

(Spode, 2003; Hopp, 2005). Es sollte nun getestet werden, ob die RA-Mutanten von Ste50 mit Cdc42 interagieren. Hierfür wurde ein Two-Hybrid-Analyse durchgeführt.

In Abbildung 3.10 ist zu sehen, dass Ste50 mit Cdc42 interagiert. Von den drei getesteten Mutanten kann lediglich Ste50<sup>P318L</sup> nicht mit Cdc42 interagieren. Die beiden anderen Mutanten Ste50<sup>R296G,N301S</sup> und Ste50<sup>L322S</sup> interagieren mit Cdc42, was mittels Wachstum auf Histidin Mangelmedium detektierbar ist. Diese Interaktionen sind in ihrer Stärke mit der von Wildtyp Ste50 mit Cdc42 vergleichbar. Die Interaktion von Ste50 mit Ste11 wird als Positivkontrolle verwendet.

### 3.2.4 Two-Hybrid Analyse der RA-Mutanten mit Opy2

Ste50 interagiert nicht nur mit den kleinen G-Proteinen sondern auch mit dem Transmembranprotein Opy2 (Wu *et al.*, 2006). Opy2 spielt eine Rolle in der Signalweiterleitung im HOG-Signalweg und interagiert mit Ste50 unabhängig von der



#### Abbildung 3.11 Untersuchung der Interaktion von Ste50-RA-Mutanten mit Opy2 mittels Two-Hybrid Analyse

Der Hefestamm PJ187 wurde mit den angegebenen Plasmiden transformiert. Für den Wachstumstest auf leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Medium wurden die Transformanten logarithmisch angezogen. Es wurden 0,4 OD<sub>600</sub> geerntet und in 500 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Es wurden 3,5 µl aufgetropft. Nach Inkubation der Platten für 2 Tage bei 30°C wurde das Wachstum auf SD leu<sup>-</sup> trp<sup>-</sup> his<sup>-</sup> Platten dokumentiert. Als Negativkontrolle dienten die Transformationen mit den Plasmiden pAD2 bzw. pMBD.

Stamm: PJ187; Plasmide: pAD2 (EWK66), pAD-OPY2-C1 (ENB166), pAD-STE11 (ELS243) pMBD (EWK67), pMBD-STE50 (ECH199), pMBD-STE50P318L (ECH191), pMBD-STE50-R296G,N301S (ELS563) pMBD-STE50L322S (ECH192).

Induktion des HOG-Signalwegs (Wu *et al.*, 2006; Tatebayashi *et al.*, 2007). Da Opy2 eine Transmembrandomäne besitzt, musste für die Analyse der Interaktion im Two-Hybrid System eine Mutante von Opy2 verwendet werden die keine Transmembrandomäne mehr besitzt. Hierfür wurde mittels PCR der C-terminale Teil (AS 116-361) von Opy2, der intrazellulär ist, mittels *in vivo* Rekombination in den mit *BamHI* linearisierten Two-Hybrid Vektor pAD-HIS3 (ELS553) kloniert. Diese Mutante von Opy2 wird als Opy2-C1 bezeichnet. Es wurde nun die Interaktion von Opy2-C1 mit den Ste50-RA Mutanten untersucht. Die Interaktion von Ste50 mit Ste11 wurde hierbei als Positivkontrolle verwendet.

In Abbildung 3.11 ist zu sehen, dass Ste50 mit Opy2-C1 interagiert. Keine der drei untersuchten Ste50-RA Mutanten zeigt eine Interaktion mit Opy2-C1. Dies erkennt man an dem fehlendem Wachstum auf Selektionsmedium. Die als Negativkontrolle verwendeten Leervektoren zeigen kein Wachstum auf Histidin Mangelmedium.

### 3.3 Plasmamembranrekrutierung von Ste50- $\Delta$ RAD

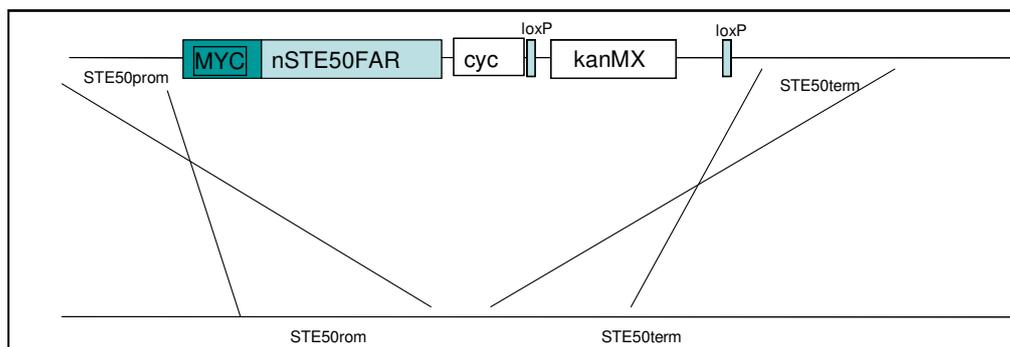
Ste50 hat in den MAPK-Signalwegen die Funktion eines regulatorischen Adaptors. Es reguliert die MAPKKK Ste11. Die starke Interaktion mit Ste11 wird durch die SAM Domänen der beiden Proteine vermittelt. Ste50 besitzt eine weitere Domäne, die RA-Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass die RA-Domäne von Ste50 die Interaktion mit den kleinen G-Proteinen Cdc42, Ras1 und Ras2 vermittelt. Wie sich diese Interaktion auf die regulatorische Funktion von Ste50 auswirkt, ist bisher nicht geklärt worden.

Ein wichtiges Merkmal der G-Proteine ist, dass sie an der Plasmamembran lokalisiert sind. Diese Lokalisation ist wichtig für die Aufgabe der G-Proteine in der Zelle (Bhattacharjya *et al.*, 1995). Ste50 ist indessen ein cytosolisches Protein. Es konnte gezeigt werden, dass Ste50 unter Überexpression von Ras2 vermehrt an die Zelloberfläche lokalisiert (Hopp, 2005). Auch konnte gezeigt werden, dass eine Assoziation zur Plasmamembran von Ste50- $\Delta$ RA zumindest im HOG-Signalweg und im filamentösen Wachstumsweg die Funktion des Proteins zumindest teilweise wieder herstellt (Wu *et al.*, 2006; Truckses *et al.*, 2006; Tatebayashi *et al.*, 2006). Welche genau die Unterschiede zu wildtypischem Ste50 im MAPK-Signaling sind wurde nicht untersucht. In Säugerzellen ist für den Ras Effektor RaGDS, welcher auch eine RA-Domäne besitzt, gezeigt worden, dass die künstliche Rekrutierung zur Membran ausreicht, um ein funktionelles Protein zu bilden (Matsubara *et al.*, 1999). Hierbei konnte die Ras-Binde-Domäne deletiert werden, ohne dass die Funktion des Proteins beeinflusst wurde. Überträgt man dieses Wissen auf Ste50, ist anzunehmen, dass die RA-Domäne für die korrekte Lokalisierung des Proteins während der Signalweiterleitung notwendig ist (Matsubara *et al.*, 1999).

### 3.3.1 Erstellung von Plasmamembran assoziiertem Ste50-ΔRA

Um einen detaillierten Vergleich zwischen Wildtyp Ste50 und membranrekrutiertem nSte50 (Ste50-ΔRAD, AS 1-235) zu erhalten, sollte das Gen *nste50FAR* anstelle von *STE50* in das Hefegenom integriert werden. Um dies zu erreichen wurden zuerst Plasmide erstellt, welches nSte50FAR unter der Kontrolle des GAL Promotoers haben. Hierfür wurden die DNA-Sequenz der 13 C-terminalen Aminosäuren von Ras2 an den nSte50 ORF mittels PCR angehängt. Dieser Bereich von Ras2 enthält die CAAX-Box. Diese ermöglicht eine posttranslationale Modifizierung mittels Farnesylierung und Palmitoylierung, welche zu einer Lokalisierung an die Plasmamembran führt. Um dies zu erreichen, wurde eine PCR mit den Primern A72 A191 durchgeführt.

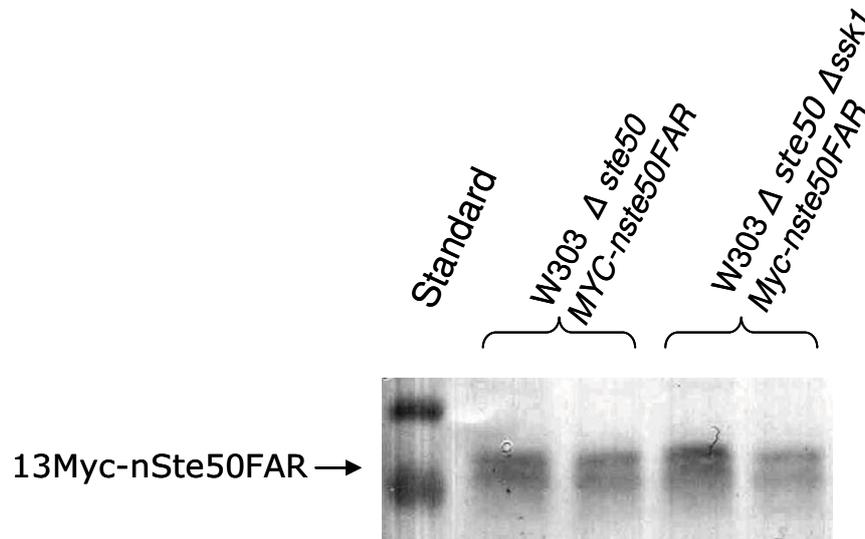
In einem zweiten PCR Schritt wurde mit den Primern A72 und A89 das Insert *rec1-nste50FAR-rec2* - für eine *in vivo* Rekombination in die Plasmide pGREG526 und pGREG576 - hergestellt. Bei den so hergestellten Plasmide ENB71 und ENB130 wird *nste50FAR* von dem *GAL*-Promotor kontrolliert. In einem anderen Schritt wurde der *GAL*-Promotor von pGREG526 durch Ligation nach Verdau mit *SacI/SpeI* mit dem *STE50* Promotor ausgetauscht, in diesem Schritt wurde das Plasmid p52650p (ENB85) hergestellt. Um nun *nste50FAR* unter die Kontrolle des *STE50* Promotors zu stellen wurde aus dem Plasmid ENB71 *nste50FAR*-Fragment durch Restriktion (*EcoRI/XhoI*) ausgeschnitten und in den mit *EcoRI/XhoI* linearisierten Vektor ENB85 mittels *in vivo* Rekombination eingefügt. Das so konstruierte Plasmid ENB111 enthält den *STE50* Promotor vor dem Gen *13Myc-nste50FAR*. Um eine Integration in das Hefegenom zu ermöglichen, wurde der *STE50* Terminator (419bp) mittels der Primer A231 und A232 durch eine PCR amplifiziert und in das Plasmid hinter die *loxP*-kanMX-*loxP* Kasette eingefügt. Das so entstandene Plasmid ENB187 wurde mit *SacI/XmnI* linearisiert und das *nste50FAR* Konstrukt in die Stämme W303-1A Δ*ste50* (WAM4) und W303-1A Δ*ste50*



**Abbildung 3.12 Schematische Darstellung der Integration von *nste50FAR* ins Hefegenom.**

Das mit *SacI/XmnI* lineierte Plasmid ENB187 wurde in die Hefestämme mittels homologer Rekombination in das Hefegenom integriert. Die inserierte Sequenz enthält einen *STE50* Promotor, ein 13\**Myc* als Tag, das Gen *nste50FAR*, den *Cyc* Terminator, eine *loxP*-kanMX-*loxP* Kasette zur Selektion und den *STE50* Terminus.

$\Delta ssk1$  (HCH129) integriert (siehe Abbildung 3.12). Für eine erfolgreiche Integration wurde auf Geneticinresistenz (G418) selektiert, und positive Stämme wurden auf Expression des 13 Myc-*nste50FAR* Genprodukts mittels Westernblotanalyse untersucht (Abbildung 3.13). Als weitere Kontrolle wurde das Wachstum der Stämme unter hochosmolarem Stress überprüft.



**Abbildung 3.13 Expressionsanalyse von integriertem Myc-*nste50FAR***

Klone die auf Selektionsmedium wachsen können wurden in YPD angezogen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Rohextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt. Es wurde ein Anti-Myc Antikörper verwendet. Stämme: W303 MYC-*nste50FAR* (HNB165, HNB166); W303 Myc-*nste50FAR*  $\Delta ssk1$  (HNB167, HNB168)

### 3.3.2 Untersuchungen zur Funktion von plasmamembranrekrutiertem Ste50- $\Delta$ RAD im Hochosmolaren Antwortweg

In diesem Teil der Arbeit soll die Funktion der Ste50-RA Domäne im HOG-Signalweg untersucht werden. Um dies zu erreichen wird die Funktion von nSte50FAR mit wildtypischen Ste50 verglichen werden. Es wurde bereits gezeigt dass eine Plasmamembranrekrutierung von Ste50- $\Delta$ RA bei Überexpression eine *STE50* Deletion und eine *OPY2* Deletion im Hochosmolaren Antwortweg komplementieren kann (Wu *et al.*, 2006). Ob dies auch für nSte50FAR zutrifft - wenn es unter Kontrolle des *STE50* Promotors ist - soll hier untersucht werden. Auch soll überprüft werden, ob *nste50FAR*

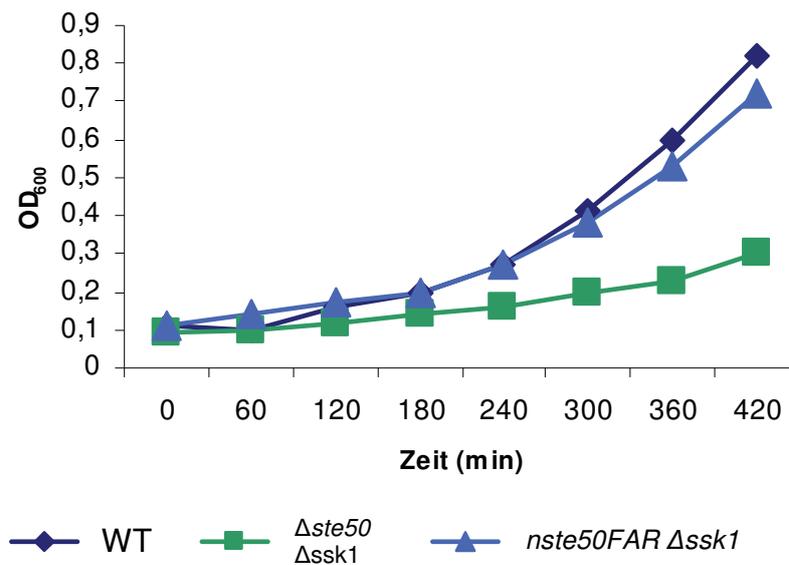
auch eine *SHO1* Deletion komplementieren kann. Sho1 ist im HOG-Signalweg oberhalb von Ste50 eingeordnet und interagiert mit diesem. Es gilt zu klären, ob die Funktion der RA-Domäne nur eine Lokalisierung an die Plasmamembran von Ste50 ist, und so auch Ste11 an die Membran rekrutiert (Wu et al., 2006). Hat die RA-Domäne noch eine weitergehende Rolle, sollten sich Unterschiede bei den Tests zu wildtyp Ste50 zeigen. So ließen sich Rückschlüsse auf die Funktion der RA-Domäne im HOG-Signalweg ziehen. Hierfür werden verschiedene Tests durchgeführt. So soll das Wachstum auf hoch osmolarem Medium untersucht werden und eine epistatische Analyse mit *nste50FAR* durchgeführt werden. Ebenso soll der Crosstalk mit dem Ras/cAMP Signalweg mittels eines *CRE-lacZ* Reporters untersucht werden wobei auch analysiert wird, wie *nste50FAR* den Crosstalk zwischen dem HOG-Signalweg und dem Pheromonantwortweg beeinflusst.

### **3.3.2.1 nSte50FAR kann den Wachstumsdefekt einer *STE50* Deletion und einer *OPY2* Deletion im HOG-Signalweg komplementieren**

Hierfür wurden die Stämme W303-1A, W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  und W303-1A *nste50FAR*  $\Delta ssk1$  in Vollmedium mit 0,4 M NaCl auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 angeimpft. Das Wachstum der Stämme wurde durch Messung der  $OD_{600}$  über einen Zeitraum von 7 Stunden gemessen.

Es ist zu sehen, dass der Wildtyp Stamm unter hochosmolaren Bedingungen wachsen kann (Abbildung 3.14). Der Stamm W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  weist nur ein minimales Wachstum in flüssig Medium mit 0,4 M NaCl auf. Der W303-1A Stamm mit integriertem *nste50FAR* am *STE50* Locus zeigt Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen, etwas geringer jedoch als das des Wildtyp Stamms (Abbildung 3.14). Neben dem Wachstum in flüssigem Medium, wurde das Wachstum auch auf festem Medium überprüft. Die zu untersuchenden Stämme wurden in flüssigem Medium bis zur logarithmische Phase angezogen. Dann wurden 0,4  $OD_{600}$  geerntet und seriell verdünnt. Die Verdünnungen wurden dann auf Platten ohne und mit erhöhter Salzkonzentration getropft. Diese wurden bei 30°C inkubiert und das Wachstum nach drei bis fünf Tagen dokumentiert (Abbildung 3.15). Die Expression von nSte50FAR anstatt von Wildtyp Ste50 kann, wie auch in flüssigem Medium, Wachstum unter hochosmotischen Bedingungen vermitteln. Dies zeigt sich durch wildtypisches Wachstum auf 0,7 M und 1,0 M NaCl (Abbildung 3.15).

Es wurden noch weitere Stämme, unter anderem solche mit einer *OPY2* Deletion untersucht. Opy2 wurde als Bestandteil des Sho1 Arms im HOG-Signalweg impliziert und als Interaktionspartner von Ste50 beschrieben (Wu et al., 2006). Die  $\Delta opy2 \Delta ssk1$

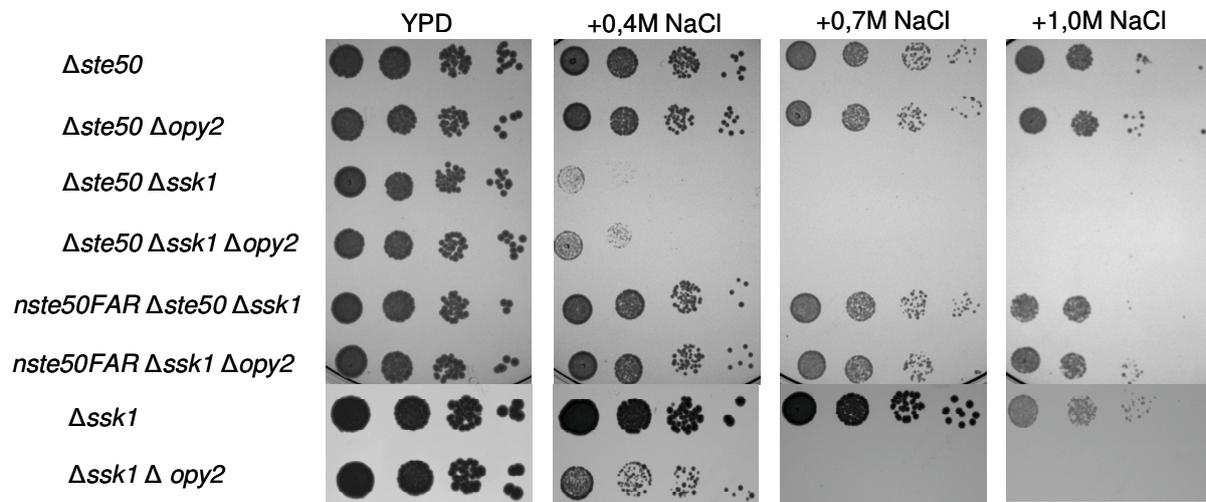


**Abbildung 3.14 Sensitivitätstest gegenüber Hyperosmolarität**  
 Wachstumskurve der angegebenen Stämme in YPD flüssig + 0,4M NaCl. Die Hefen wurden von einer Übernachtskultur in frisches Medium + Salz auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,1 angeimpft. Proben wurden nach den entsprechenden Zeitpunkten abgenommen und die OD<sub>600nm</sub> bestimmt. Stämme: WT (W303-1A, HGX10), *Δste50 Δssk1* (W303-1A *Δste50 Δssk1*, HCH100), *nste50FAR Δssk1* (W303-1A Myc-*nste50FAR Δssk1*, HNB167)

Doppeldelation zeigt noch Wachstum unter 0,4 M Salzstress, aber kein Wachstum unter höheren Salzkonzentrationen. Dies bedeutet, dass eine *Δste50* Mutante einen stärkeren Wachstumsdefektphänotypen als eine *Δopy2* Mutante im HOG-Signalweg zeigt. Es galt nun zu überprüfen, ob *nste50FAR* eine Deletion von *OPY2* im HOG-Signalweg komplementieren kann.

Es zeigt sich, dass *nste50FAR* die Osmosensitivität einer *OPY2* Deletion vollständig komplementieren kann (Abbildung 3.15). Alle Stämme können auf Vollmedium ohne Salz wachsen. Stämme in denen nur ein Weg des HOG-Signalwegs gestört ist, wachsen auch gut auf hochosmolarem Medium, so z.B. die Stämme *Δste50*, *Δssk1* und *Δste50 Δopy2*. Dass eine *OPY2*, *STE50* Doppeldelation auf Medium mit Salz wachsen kann, zeigt, dass diese im selben Arm des HOG-Signalwegs aktiv sind. Die Deletion von *OPY2* im *nste50FAR Δssk1* Hintergrund hat keinen negativen Einfluss auf die Osmotoleranz des Stammes. Der Stamm zeigt normales Wachstum unter allen getesteten Bedingungen. Der Stamm *Δste50 Δssk1*, welcher nicht in der Lage ist unter hohen Salzkonzentrationen zu wachsen, wurde als Negativkontrolle verwendet. Eine zusätzliche Deletion von *OPY2* in diesem Hintergrund zeigt keinen zusätzlichen Effekt (Abbildung 3.15).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Deletion von *OPY2* einen Verlust der Osmotoleranz in einem  $\Delta$ *ssk1* Stamm hervorruft, der aber nicht so stark wie der einer



**Abbildung 3.15 nSte50FAR komplementiert die Osmosensitivität von *STE50* und *OPY2* Deletionen im HOG-Signalweg**

Dargestellt ist eine Wachstumsanalyse verschiedener Hefestämme auf verschiedenen Medien. Logarithmisch wachsende Zellen verschiedener Stammhintergründe wurden geerntet. Es wurden 1:10 Verdünnungen hergestellt. Die Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) wurden auf YPD Platten mit 0 M, 0,4 M, 0,7 M und 1,0 M NaCl getropft. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum der Zellen dokumentiert. Stämme:  $\Delta$ *ste50* (W303-1A  $\Delta$ *ste50*, HFB93),  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *opy2* (W303-1A  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *opy2*, HNB212);  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *ssk1* (W303-1A  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *ssk1*, HCH100);  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *ssk1*  $\Delta$ *opy2* (W303-1A  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *ssk1*  $\Delta$ *opy2*, HNB213); *nste50FAR*  $\Delta$ *ssk1* (W303-1A Myc-*nste50FAR*  $\Delta$ *ssk1*, HNB167); *nste50FAR*  $\Delta$ *ssk1*  $\Delta$ *opy2* (W303-1A Myc-*nste50FAR*  $\Delta$ *ssk1*  $\Delta$ *opy2*, HNB218);  $\Delta$ *ssk1* (W303-1A  $\Delta$ *ssk1*, HCH92);  $\Delta$ *ssk1*  $\Delta$ *opy2* (W303-1A  $\Delta$ *ssk1*  $\Delta$ *opy2*, HNB215)

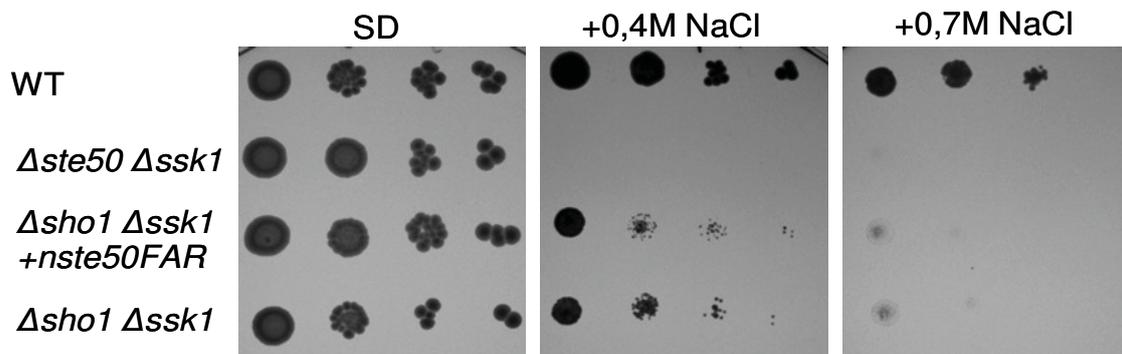
*STE50 SSK1* Doppeldelation ist. Die Expression von *nste50FAR* kann sowohl eine *STE50* Deletion als auch eine *OPY2* Deletion in der Osmotoleranz komplementieren.

### 3.3.2.2 nSte50FAR kann den Wachstumsdefekt einer *SHO1* Deletion im HOG-Signalweg nicht komplementieren

Ein wichtiges Protein im HOG-Signalweg ist das Protein Sho1. Es besteht aus 4 Transmembrandomänen und einem cytoplasmatischen Ende (Maeda *et al.*, 1995). Die postulierte Funktion von Sho1 lässt vermuten, dass Sho1 möglicherweise eine Rolle bei der Rekrutierung des Ste11-Ste50 Komplexes und Pbs2 zu einem Signalkomplex spielt und diesen als Adaptor mit den Osmosensoren Hkr1 und Msb2 verbindet (Maeda *et al.*, 1995; Tatebayashi *et al.*, 2006, Tatebayashi *et al.*, 2007). Sho1 ist als ein möglicher Interaktionspartner von Ste50 beschrieben worden (Tatebayashi *et al.*, 2006). Es galt daher zu testen, ob plasmamembranrekrutiertes nSte50FAR den Osmosensitivitätsphänotypen einer *SHO1* Deletion komplementieren kann. In vorherigen

Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Komplementation für eine *OPY2* Deletion möglich ist.

Um dies zu testen, wurde der Stamm W303-1A  $\Delta sho1 \Delta ssk1$  mit einer Vektorkontrolle und dem Plasmid p526-STE50p-nSTE50FAR transformiert. Die Expression von *nste50FAR* auf diesem Plasmid steht unter Kontrolle des *STE50* Eigenpromotors. Die



### Abbildung 3.16 Osmosensitivitätstest gegenüber NaCl

Dargestellt ist eine Wachstumsanalyse verschiedener Hefestämme auf unterschiedlichen Medien. Logarithmisch wachsende Zellen verschiedener Stammhintergründe wurden geerntet. Es wurden serielle 1:10 Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) auf SD Platten mit 0 M, 0,4 M und 0,7 M NaCl getropft. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum der Zellen dokumentiert.

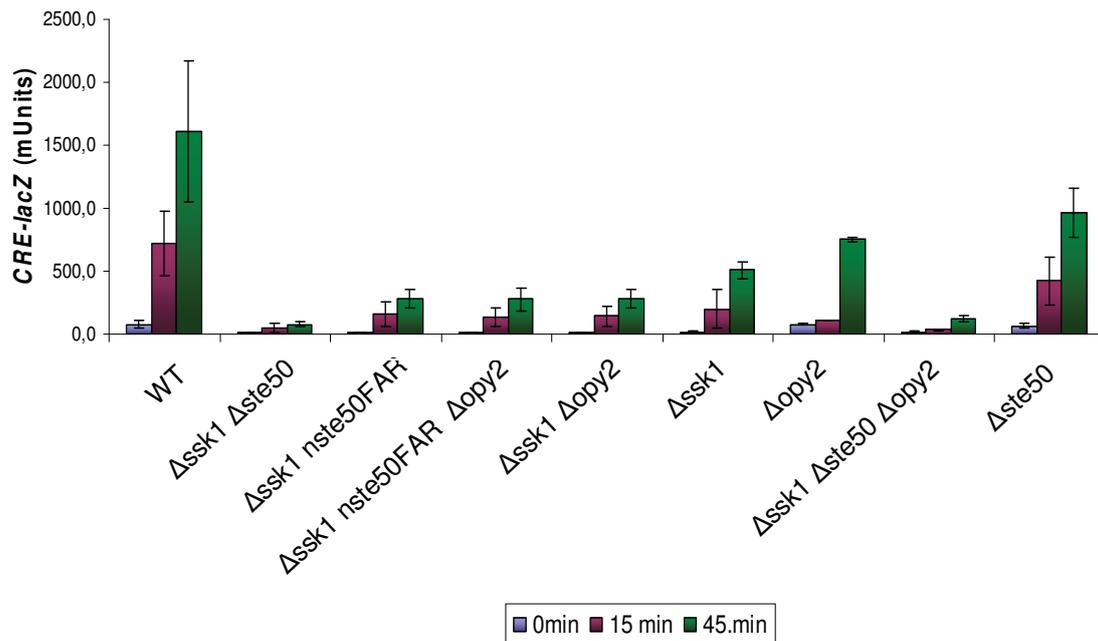
Stämme: WT (W303-1A, HGX10),  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  (W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1$ , HCH100),  $\Delta sho1 \Delta ssk1$  (W303-1A  $\Delta sho1 \Delta ssk1$ , HCH253); Plasmide: LV (pGREG526, EWK75); *nste50FAR* (p526-STE50p-nste50FAR, ENB111)

Transformanden wurden logarithmisch angezogen und dann seriell 1:10 verdünnt und auf Minimalmedium ohne und mit Salz aufgetropft.

Als Positivkontrolle wurde ein W303-1A Wildtypstamm verwendet. Alle überprüften Stämme können auf Minimalmedium ohne Salz gut wachsen (Abbildung 3.16). Einzig der Wildtypstamm kann auf Medium mit 0,4 M und 0,7 M NaCl wachsen. Der als Osmosensitivitätskontrolle verwendete Stamm  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  zeigt kein Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen. Ein  $\Delta sho1 \Delta ssk1$  Stamm zeigt Osmosensitivität, kann aber noch unverdünnt auf einer niedrigen Salzkonzentration von 0,4 M wachsen (Abbildung 3.16). Die Expression von nSte50FAR zeigt keine vermittelte Osmotoleranz. Die Zellen zeigen nur bei 0,4 M NaCl Wachstum bei unverdünnten Zellen und kein Wachstum bei der höheren Salzkonzentration von 0,7 M NaCl.

### **3.3.2.3 *nste50FAR* zeigt eine Abschwächung der Aktivierung von *CRE-lacZ* nach Salzstress**

Wird Hog1 durch Salzstress aktiviert, so aktiviert und bindet es mehrere Transkriptionsfaktoren wie Msn2/4, Hot1 und auch Sko1. Hot1 reguliert Gene, die für die Glycerolsynthese benötigt werden. Msn2/4 bindet an die STRE Sequenz. Sko1 reguliert ein eigenes Subset an Genen über die Bindung an ein *CRE* Element. Die Aktivität von Sko1 wird nicht nur von Hog1 gelenkt sondern auch von der Aktivität der PKA, die eine dämpfende Wirkung auf Sko1 hat (siehe Einleitung). Ein *Cre*-Element wird negativ durch den Ras/cAMP Weg kontrolliert (Proft *et al.*, 2001, Tabeyashi *et al.*, 2006). Der Transkriptionsfaktor Sko1 ist für die Regulation von *CRE*-Sequenzen verantwortlich. Sko1 wird durch Hog1 so phosphoryliert, dass er vom Repressor zum Aktivator wird und dann die Expression der so regulierten Gene auslöst. Sko1 wird durch die PKA an anderer Stelle phosphoryliert, was dazu führt, dass Sko1 den Zellkern verlässt, und dann nicht als Aktivator aktiv werden kann. Dieser Crosstalk der beiden Wege reguliert Sko1. *CRE-lacZ* ist ein Reporterkonstrukt, bei dem die  $\beta$ -Galaktosidase unter Kontrolle des cAMP-Response Elements (*CRE*) aus dem *ENA1* Promotor steht (Proft *et al.*, 2001). *ENA1* kodiert für eine Natriumpumpe, die unter Salzstress oder auch alkalinen Bedingungen verstärkt expremiert wird. Dieser Reporter wird spezifisch bei Osmostress aktiviert. Verschiedene Stammhintergründe wurden mit dem Reportergeren *CRE-lacZ* transformiert und die entstandenen Transformanden mit und ohne Zugabe von Salz inkubiert. Nach Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 0,4 M wurde nach 15 und 45 Minuten die Zellen geerntet. Rohextrakte wurden hergestellt und hinsichtlich ihrer  $\beta$ -Galaktosidase Expression untersucht.



### Abbildung 3.17 Messung der *CRE-lacZ* Expression unter Osmostress

Reporteranalyse der Expression von *CRE-lacZ*. Verschiedene Stammhintergründe wurden mit dem Reporterkonstrukt *CRE-lacZ* transformiert. Die Hefen wurden auf selektiven Minimalmedium logarithmisch angezogen. Es wurde NaCl zu einer finalen Konzentration von 0,4 M zugegeben. Proben wurden nach 0, 15 und 45 Minuten entnommen und aufgeschlossen. Rohextrakte wurden hergestellt und die *lacZ* Aktivität mit ONPG in mUnits/mg Gesamtprotein ermittelt.

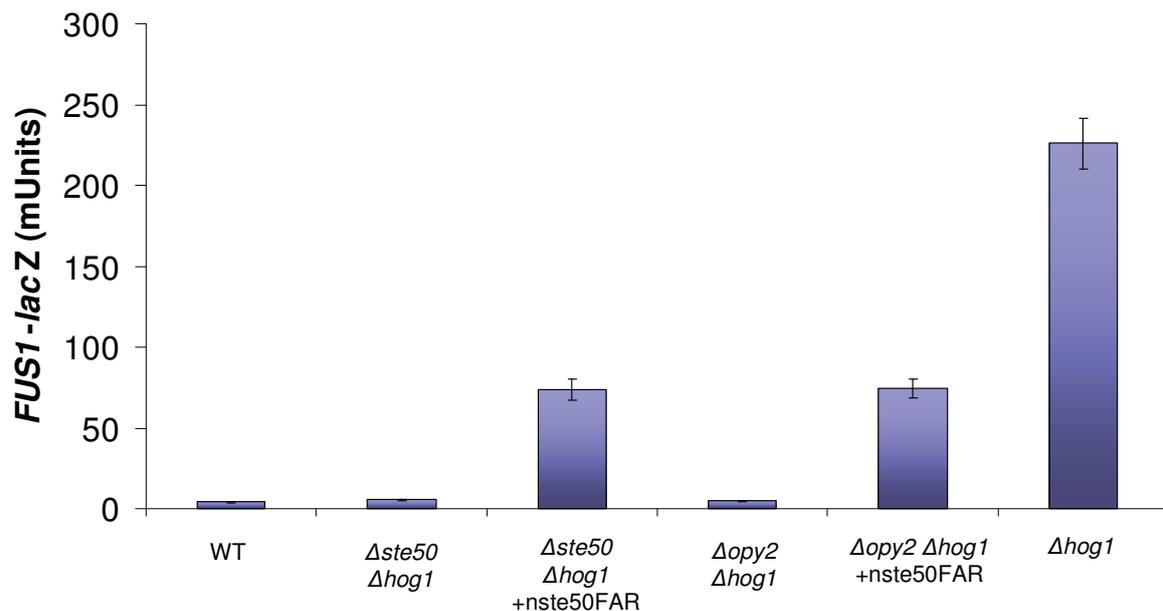
Stämme: WT (W303-1A, HGX10); *Δste50 Δopy2* (W303-1A *Δste50 Δopy2*, HNB212); *Δste50 Δssk1* (W303-1A *Δste50 Δssk1*, HCH100); *Δste50 Δssk1 Δopy2* (W303-1A *Δste50 Δssk1 Δopy2*, HNB213); *nste50FAR Δssk1* (W303-1A Myc-*nste50FAR Δssk1*, HNB167); *nste50FAR Δssk1 Δopy2* (W303-1A Myc-*nste50FAR Δssk1 Δopy2*, HNB218); *Δssk1* (W303-1A *Δssk1*, HCH92); *Δssk1 Δopy2* (W303-1A *Δssk1 Δopy2*, HNB215); *Δopy2* (W303-1A *Δopy2*, HNB210)  
Plasmid: *CRE-lacZ* (pMP253)

Die Zugabe von Salz führt im Wildtypstamm nach 45 Minuten zu einer starken Expression des Reportergens *CRE-lacZ* auf 1600 mUnits. Eine Doppeldeletion von *STE50* und *SSK1* führt zu einem fast kompletten Verlust der Expression von *CRE-lacZ*. Bei dieser Doppelmutante ist sowohl der Sho1- als auch der Sln1-Weg unterbrochen. Betrachtet man die *Δssk1* Stämme, die *nste50FAR* anstatt von wildtypischen *Ste50* exprimieren, so zeigt sich eine Expression von *Cre-lacZ* nach Zugabe von Salz, bei einem *Δssk1 nste50FAR* Stamm bzw. *Δssk1 Δopy2 nste50FAR* Stamm bei 20% gegenüber dem Wildtypstamm liegt (Abbildung 3.17). Eine *OPY2* Deletion führt zu keiner Veränderung der *CRE-lacZ* Expression in Stämmen mit *nste50FAR*. Wird hingegen ein *Δssk1* Stamm verwendet, so wird die Aktivierung durch Salz um 63% reduziert. Der deutlichere Effekt einer *Δssk1* Mutante lässt sich vielleicht mit dem Kälteschock der Zellen erklären, da diese vor dem Aufschluss auf 4°C abgekühlt werden. *Ssk1* spielt eine Rolle in der *Hog1* Aktivierung durch Kältestress (Hayashi & Maeda, 2006). Dies erklärt auch die verminderte Basisaktivität bei 0 min (17 mUnits bei *Δssk1* zu 77 mUnits bei WT). Der

Einfluss einer *OPY2* Deletion ist deutlicher als bei einer *STE50* Deletion, aber schwächer als bei einer *SSK1* Deletion. Hier ist wie bei  $\Delta ste50$  gegenüber dem WT auch die Basisaktivität nicht verändert. Bei der Doppelmutante  $\Delta ssk1 \Delta opy2$  erreicht das Reporter Expressionslevel 20% des Wildtyp Levels. Eine Dreifachmutante  $\Delta ssk1 \Delta ste50 \Delta opy2$  zeigt das gleiche Aktivitätslevel wie die  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Doppelmutante. Wird *STE50* deletiert, so wird die Aktivierung des Reporters auf 950 mUnits abgeschwächt (Abbildung 3.17). Es zeigt sich somit, dass die Expression von *CRE-lacZ* ein anderes Bild zeigt als das Wachstum unter Salzstress. Während bei dem Wachstum nur minimale Unterschiede zwischen Wildtypstamm und Stämmen mit *nste50FAR* festgestellt werden konnten sind diese bei *CRE-lacZ* Messungen sehr deutlich. Die Glycerinsynthese, das wichtigste Mittel für Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen, wird nicht durch *Sko1* reguliert. Wie es zu der Abschwächung der *CRE-lacZ* Expression kommt, lässt sich vielleicht auf das Fehlen der RA Domäne bei *nste50FAR* Stämmen zurückführen. Da die RA Domäne fehlt, kann *Ste50* nicht mehr mit *Ras2* interagieren, was andererseits zu einer vermehrten Aktivierung von *Cyr1* und damit der PKA führt. Dies hätte dann einen negativen Einfluss auf die Aktivität von *Sko1*, was zu der gemessenen geringeren *CRE-lacZ* Expression führt (s. Diskussion 4.2.1).

### 3.3.2.4 Reduzierter Crosstalk zwischen HOG-Signalweg und Pheromonantwort durch plasmamembranrekrutiertes nSte50

Die MAPK Signalwege leiten das Signal sehr spezifisch weiter, um für den jeweiligen Stress die richtige Antwort zu generieren. Wird jedoch die osmotische Aktivierung von Hog1 verhindert, zum Beispiel durch eine  $\Delta pbs2$  oder  $\Delta hog1$  Mutation, aktiviert der Stress unter anderem den Pheromonantwortweg was mittels eines Pheromon-spezifischen Reporters *FUS1-lacZ* nachgewiesen werden kann (Hall *et al.*, 1996; O'Rourke and Herskowitz, 1998). Dieser physiologisch unerwünschte Crosstalk ist abhängig vom Sho1 Arm des Hog Weges und unabhängig von den Pheromonantwort-spezifischen Proteinen Ste4 und Ste5 (Cullen *et al.*, 2004; O'Rourke and Herskowitz, 2002). Eine Deletion von *STE50* unterbricht den Crosstalk. Es gilt nun zu klären, ob nSte50FAR auch den Crosstalk aktivieren kann, und ob Opy2 in diesem Zusammenhang auch benötigt wird.



**Abbildung 3.18 Einfluss von plasmamembranrekrutiertem nSte50 auf den Crosstalk zwischen HOG-Weg und Pheromonantwort**

Die angegebenen Stämme wurden mit einem *FUS1-lacZ* Reporterplasmid und entweder mit Vektor als Kontrolle oder mit p526-50p-nSTE50FAR transformiert. Die Transformanten wurden in einer logarithmischen Kultur zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,4-06 angezogen, dann wurde NaCl zu einer Endkonzentration von 0,4 M zugegeben. Die Zellen wurden nach 8h geerntet. Die Rohextrakte wurden zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktoasidase Aktivität benutzt. Die spezifische Aktivität wurde mittels der Gesamtproteinmenge bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Stämme: WT (W303-1A HGX10)  $\Delta ste50 \Delta hog1$  (W303  $\Delta ste50 \Delta hog1$ , HCH286);  $\Delta hog1$  (W303  $\Delta hog1$ , HCH288);  $\Delta hog1 \Delta opy2$  (W303  $\Delta hog1 \Delta opy2$ , HNB204), Plasmide: *FUS1-lacZ* (pMG10, EFB13), LV (pGREG526, EWK75), *nste50FAR* (p526-50p-*nste50FAR*, ENB111)

Hierfür wurden die Stämme mit dem Reporter gen *FUS1-lacZ* und einem Leervektor als Kontrolle oder p526-50p-nste50FAR transformiert, und logarithmisch wachsende Zellen mit 0,4 M NaCl induziert. Nach 8 Stunden wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Die Rohextrakte wurden auf ihre  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität hin untersucht.

Eine Deletion von *HOG1* führt zu einer starken Aktivierung der Expression des Reporterkonstruktes *FUS1-lacZ* (Abbildung 3.18). Es kommt zum Crosstalk. Wird nun der Sho1 Arm unterbrochen, so zeigt sich keine Transkriptionsaktivierung von *FUS1-lacZ*. Dies trifft sowohl auf die Deletion von *OPY2* als auch auf die Deletion von *STE50* zu. Exprimieren die Stämme hingegen plasmamembranrekrutiertes nSte50FAR so wird der Crosstalk wieder eingeleitet. Die Stärke der Aktivierung von *FUS1-lacZ* liegt bei einem Drittel im Vergleich zum Wildtyp. Dies trifft sowohl auf  $\Delta ste50 \Delta hog1$  als auch auf  $\Delta opy2 \Delta hog1$  zu (Abbildung 3.18).

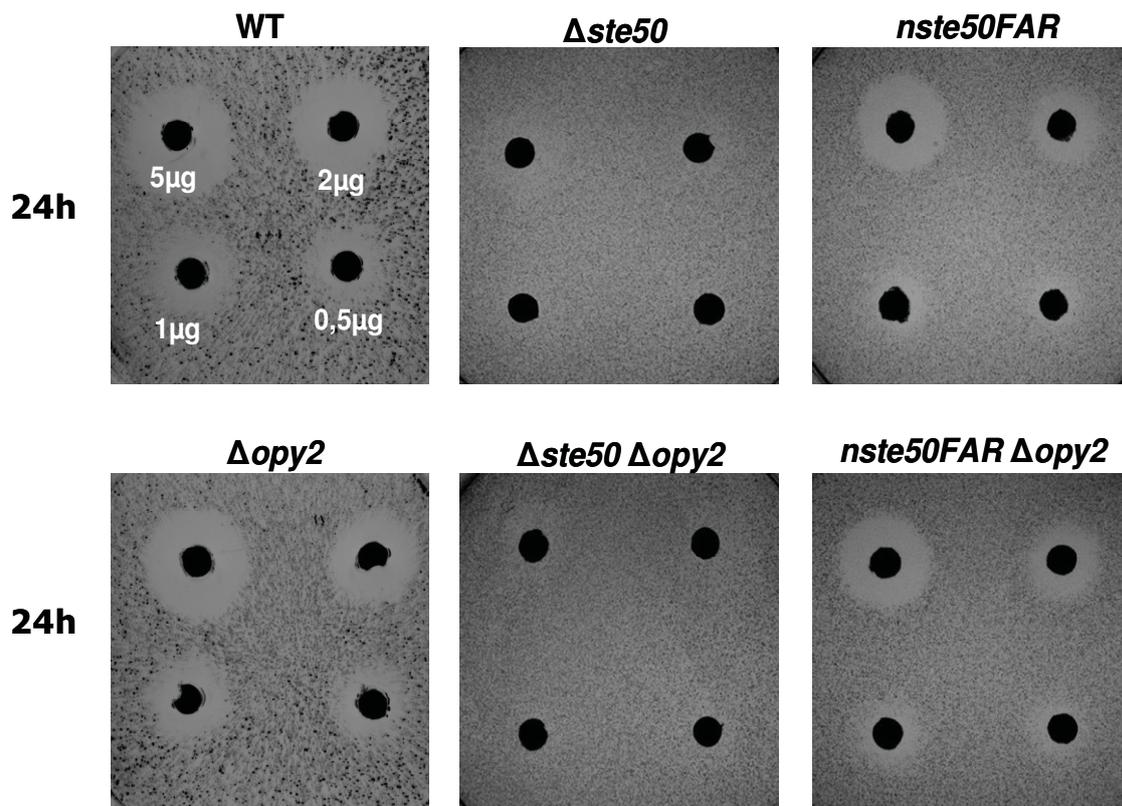
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass membranassoziierten *nste50FAR* sowohl eine *STE50* als auch eine *OPY2* Deletion komplementieren kann. Das Level des Crosstalk ist gegenüber wildtypischen *STE50* reduziert, entspricht allerdings dem Level der *FUS1-lacZ* Aktivierung im Pheromonantwortweg (siehe 3.3.3.2).

### **3.3.3 Untersuchungen zur Funktion von Plasmamembranrekrutiertem Ste50- $\Delta$ RAD in der Pheromonantwort**

Die Funktion der RA-Domäne von Ste50 ist auch im Pheromonantwortweg noch nicht geklärt worden. Eine Deletion der Domäne hat den Funktionsverlust des Ste50 Proteins in diesem Signalweg zur Folge. Durch den Vergleich in der Funktion von *nste50FAR* mit wildtypischen Ste50 soll auch die Funktion der RA-Domäne in diesem Signalweg weiter bestimmt werden. Zu klären ist ebenfalls, ob *OPY2* eine Rolle in dem Pheromonantwortweg spielt und ob diese wie im HOG-Signalweg von *nste50FAR* komplementiert werden kann. Desweiteren wird die Adaption an Paarungspheromon, und die Expression des *FUS1-lacZ* Reportergens nach Induktion mit  $\alpha$ -Faktor untersucht.

#### **3.3.3.1 Haloassay zur Analyse der Adaption an Pheromon**

Haploide Hefezellen reagieren auf die Präsenz von Paarungspheromon mit morphologischen Veränderungen, indem sie zuerst in den G1-Zellzyklus-Arrest gehen. Bei anhaltendem Reiz können sich die Zellen an das Signal adaptieren, was ein vegetatives Wachstum ermöglicht. Diese Adaption kann in einem Haloassay gemessen werden. Die Zellen werden hierfür in Topagar ausgebracht, und es wird Pheromon ( $\alpha$ -



### Abbildung 3.19 Haloassay zur Analyse der Pheromonsensitivität

Die angegebenen Stämme wurden logarithmisch angezogen. Es wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen in Topagar ausgebracht. Anschließend wurde  $\alpha$ -Faktor in den Mengen 5  $\mu\text{g}$ , 2  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , und 0,5  $\mu\text{g}$  aufgetropft. Die Platten wurden für 24 Stunden inkubiert und anschließend das Wachstum festgehalten. Stämme: WT (W303-1A, HGX10);  $\Delta ste50$  (W303-1A  $\Delta ste50$ , HFB93);  $\Delta opy2$  (W303-1A  $\Delta opy2$ , HNB210);  $\Delta ste50 \Delta opy2$  (W303-1A  $\Delta ste50 \Delta opy2$ , HNB212); *nste50FAR* (W303-1A Myc-*nste50FAR*, HNB165); *nste50FAR*  $\Delta opy2$  (W303-1A Myc-*nste50FAR*  $\Delta opy2$ , HNB216)

Faktor) in verschiedenen Mengen aufgetropft. Wenn die Zellen gegenüber Pheromon sensitiv sind, bilden sich Hemmhöfe um diese Tropfen.

Es zeigt sich, dass der wildtypische Stamm nach 24 Stunden einen Hemmhof bei allen getesteten  $\alpha$ -Faktor Mengen zeigt. Eine Deletion von *STE50* führt zu einer verminderten Sensitivität und keinem sichtbaren Hemmhof (Abbildung 3.19). Eine zusätzliche Deletion von *OPY2* zeigt keinen Einfluss auf die Pheromonsensitivität. Eine  $\Delta opy2$  Mutante alleine zeigt keinen Einfluss auf die Größe der Halos. In einem Stamm mit *nste50FAR* im *STE50* Locus zeigt die Größe des Hemmhofes eine minimal Verkleinerung um 10% im Durchmesser. Wird *OPY2* zusätzlich deletiert, ändert dies nicht die Größe der Hemmhöfe (Abbildung 3.19). Auch in der Adaption zeigen die untersuchten Stämme keine Abweichungen vom Wildtyp. Die Halos schrumpfen im gleichen Maße.

### 3.3.3.2 Expression von *FUS1-lacZ*

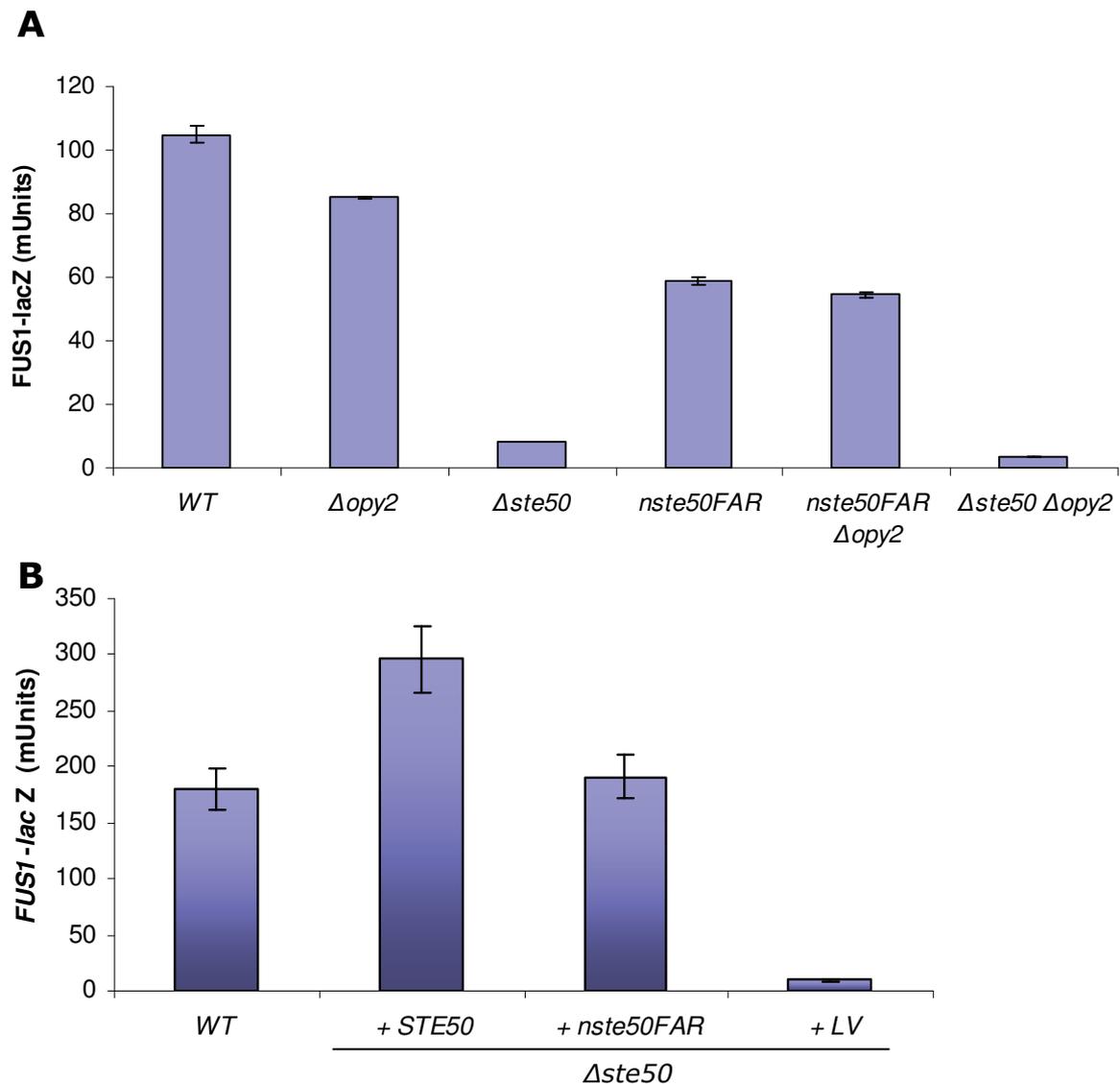
Im vorherigen Experiment zeigt sich, dass eine *OPY2 Deletion* keinen detektierbaren Unterschied zum Wildtyp bei dem pheromoninduzierten Zellzyklusarrest aufzeigt. Es wird ebenfalls deutlich, dass membranrekrutiertes nSte50FAR eine  $\Delta ste50$  Mutation komplementieren kann. Um neben der phänotypischen Analyse weitere Daten und so ein genaueres Bild der Funktion von *nste50FAR* und der RA-Domäne in der Pheromonantwort zu gewinnen, sollte die Aktivierung des Paarungspheromonspezifischen Reporter *FUS1-lacZ* untersucht werden. *FUS1* ist ein wichtiges Zielgen der Pheromon vermittelten MAPK-Kaskade (Truehard & Fink, 1989).

Hierfür wurden die Stämme W303-1A, W303-1A  $\Delta opy2$ , W303-1A  $\Delta ste50$ , W303-1A Myc-*nste50FAR*, W303-1A Myc-*nste50FAR*  $\Delta opy2$  und W303-1A  $\Delta ste50$   $\Delta opy2$  mit dem Reporter gen *FUS1-lacZ* transformiert. Die Transformanden wurden logarithmisch angezogen, und dann für 90 Minuten mit 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Faktor induziert. Die Zellen wurden anschließend geerntet und die erzeugten Rohextrakte auf ihre Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase hin untersucht.

Der Wildtypstamm zeigt eine hohe Aktivierung der Expression von *FUS1-lacZ* (Abbildung 3.20). Durch die Deletion von *OPY2* wird diese Aktivierung auf achtzig Prozent des wildtypischen Levels gesenkt. Eine Deletion von *STE50* führt zu einer Senkung der *FUS1-lacZ* Aktivierung auf ein Zehntel des Wildtyps. Wird ein Stamm verwendet, der nSte50FAR anstelle von wildtypischen Ste50 exprimiert, so sinkt das Level der *FUS1-lacZ* Aktivierung auf die Hälfte der wildtypischen Aktivität. Eine zusätzliche Deletion von *OPY2* in diesem Stamm hintergrund reduziert die Expression von *FUS1-lacZ* um weitere 10% auf 54 mUnits (Abbildung 3.20 A). Wird *nste50FAR* mittels des *GAL1* Promotors überexprimiert, so wird *FUS1-lacZ* genauso stark aktiviert wie ein Wildtypstamm – jedoch unterhalb des Levels, welches durch eine *STE50* überexpression erreicht wird (Abbildung 3.20 B).

Da die Pheromon-Antwort einen zeitlichen Verlauf hat, sollte nicht nur ein einzelner Zeitpunkt untersucht werden, sondern auch die Auswirkung von nSte50FAR im Vergleich zu Ste50 über einen längeren Zeitraum. Hierfür wurden die Zellen mit entweder 1  $\mu\text{M}$  oder 5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Faktor induziert, und 300 Minuten lang Proben genommen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bestimmt.

Es zeigt sich, dass die Expression von *FUS1-lacZ* im Wildtypstamm durch die höhere  $\alpha$ -Faktor Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  um den Faktor 3,5 stärker aktiviert wird als durch 1  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Faktor (Abbildung 3.21). Die stärkste Aktivierung zeigt sich nach 120 Minuten, wobei die *FUS1-lacZ* Aktivierung bei der niedrigen Pheromonkonzentration nach 300 Minuten auf ein Viertel des maximalen Wertes fällt. Bei 5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Faktor sinkt das Expressionslevel

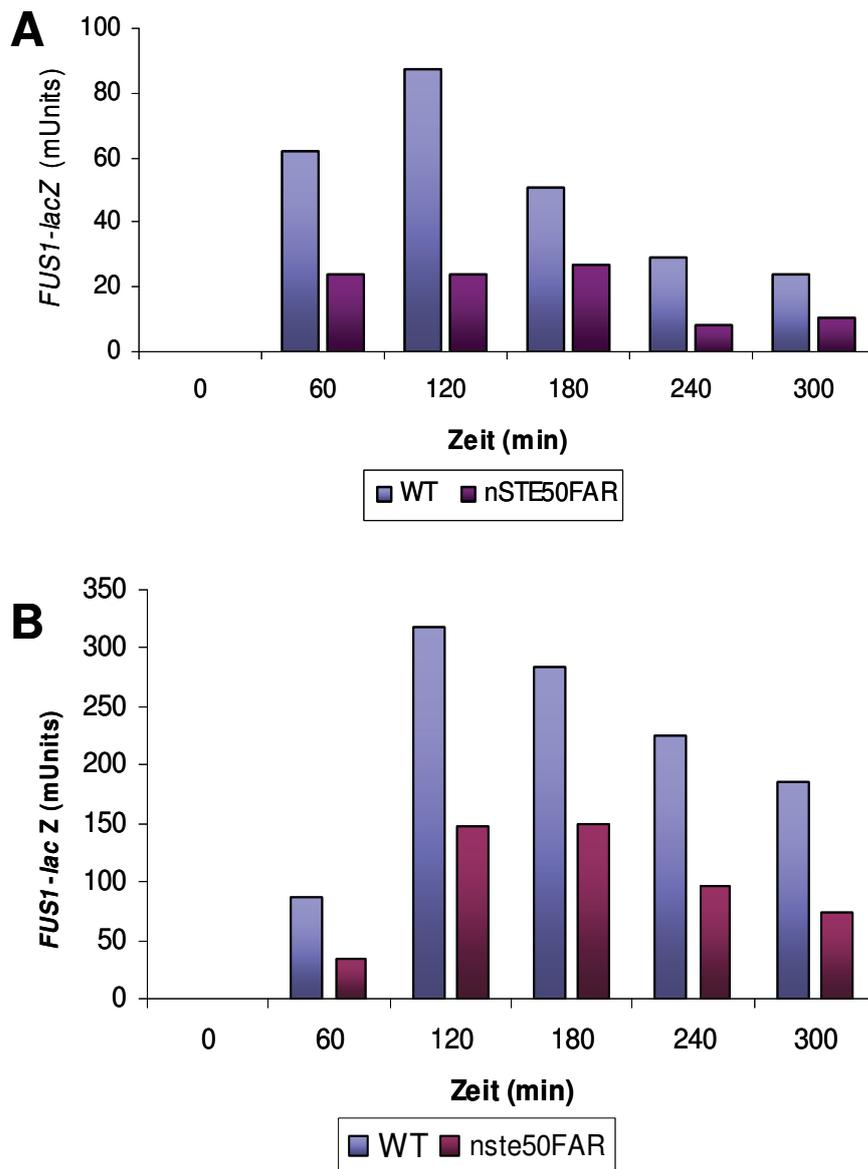


**Abbildung 3.20 Auswirkung von nSte50FAR auf die FUS1-lacZ Expression nach Zugabe von Paarungspheromon**

**A.** Integriertes *nste50FAR*. Die angegebenen Stämme wurden in flüssigen Minimalmedium angezogen. Die Zellen wurden aus einer Übernachtskultur in frischem Medium angeimpft und zu einer logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann wurde  $\alpha$ -Faktor zu einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M zugegeben. Es wurden Proben nach 90 min entnommen und Rohextrakte hergestellt. Die Rohextrakte wurden zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktoasidase Aktivität benutzt. Die spezifische Aktivität wurde mittels der Gesamtproteinmenge bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte zweier unabhängiger Messungen. Stämme: WT (W303-1A, HGX10);  $\Delta$ opy2 (W303-1A  $\Delta$ opy2, HNB210);  $\Delta$ ste50 (W303-1A  $\Delta$ ste50; WAM4) *nste50FAR* (W303-1A Myc-*nste50FAR*, HNB165); *nste50FAR*  $\Delta$ opy2 (W303-1A Myc-*nste50FAR*  $\Delta$ opy2, HNB216);  $\Delta$ ste50  $\Delta$ opy2 (W303-1A  $\Delta$ ste50  $\Delta$ opy2; HNB212); Plasmid: *FUS1-lacZ* (pMG10, EFB13) **B** Überexpression von *nste50FAR*. Stämme wurden in Minimalmedium angezogen. In der mid-log Phase wurde 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor hinzugegeben. Nach 90 min wurden die Zellen entnommen und die *FUS1-lacZ* Aktivität bestimmt. Stämme: WT (W303-1A, HGX10);  $\Delta$ ste50 (W303-1A  $\Delta$ ste50, WAM4) Plasmide: LV (pGREG526, ELS74); *STE50* (pRS416-GALp-Myc-*STE50*, ELS164); *nste50FAR* (pGREG526*nste50FAR*, ENB71); *FUS1-lacZ* (pMG10, EFB13)

von *FUS1-lacZ* im selben Zeitraum nur um ein Drittel. Der *nste50FAR* Stamm zeigt bei einer hohen Zugabe von Pheromon eine Reduktion von 50% gegenüber dem Maximum des Wildtyps (Abbildung 3.21). Auffällig ist auch, dass sich bei 120 Minuten ein Plateau bildet, welches noch bei 180 Minuten auf demselben Level ist. Erst dann fällt das Expressionslevel von *FUS1-lacZ*. Der Unterschied zwischen Wildtyp und *nste50FAR* ist bei der niedrigen  $\alpha$ -Faktor Konzentration noch deutlicher. Hier wird nur ein Viertel der maximalen Aktivierung nach 120 Minuten erreicht. Dafür wird dieses Level schon nach 60 Minuten erreicht und wird bis zum Zeitpunkt von 180 Minuten gehalten (Abbildung 3.21).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Membranrekrutierung von nSte50 einen gravierenden Einfluss auf die Aktivierung von *FUS1-lacZ* hat. Die Aktivität gegenüber wildtypischen Ste50 ist deutlich verringert. Opy2 scheint für die optimale Aktivierung von *FUS1-lacZ* durch die Pheromoninduktion benötigt zu werden.



**Abbildung 3.21 Auswirkung von integriertem *nste50FAR* auf die *FUS1-lacZ* Expression nach Zugabe von Paarungspheromon**

Die angegebenen Stämme wurden in flüssigem Minimalmedium angezogen. Die Zellen wurden aus einer Übernachtskultur in frischem Medium angeimpft und zu einer logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann wurde  $\alpha$ -Faktor zu einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M (A) oder 5  $\mu$ M (B) zugegeben. Es wurden Proben entnommen und Rohextrakte hergestellt. Die Rohextrakte wurden zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktoasidase Aktivität benutzt. Die spezifische Aktivität wurde mittels der Gesamtproteinmenge bestimmt. Stämme (Abweichung innerhalb +/- 10%): WT (W303-1A, HGX10); *nste50FAR* (W303-1A Myc-*nste50FAR*, HNB165); Plasmid: *FUS1-lacZ* (pMG10, EFB13)

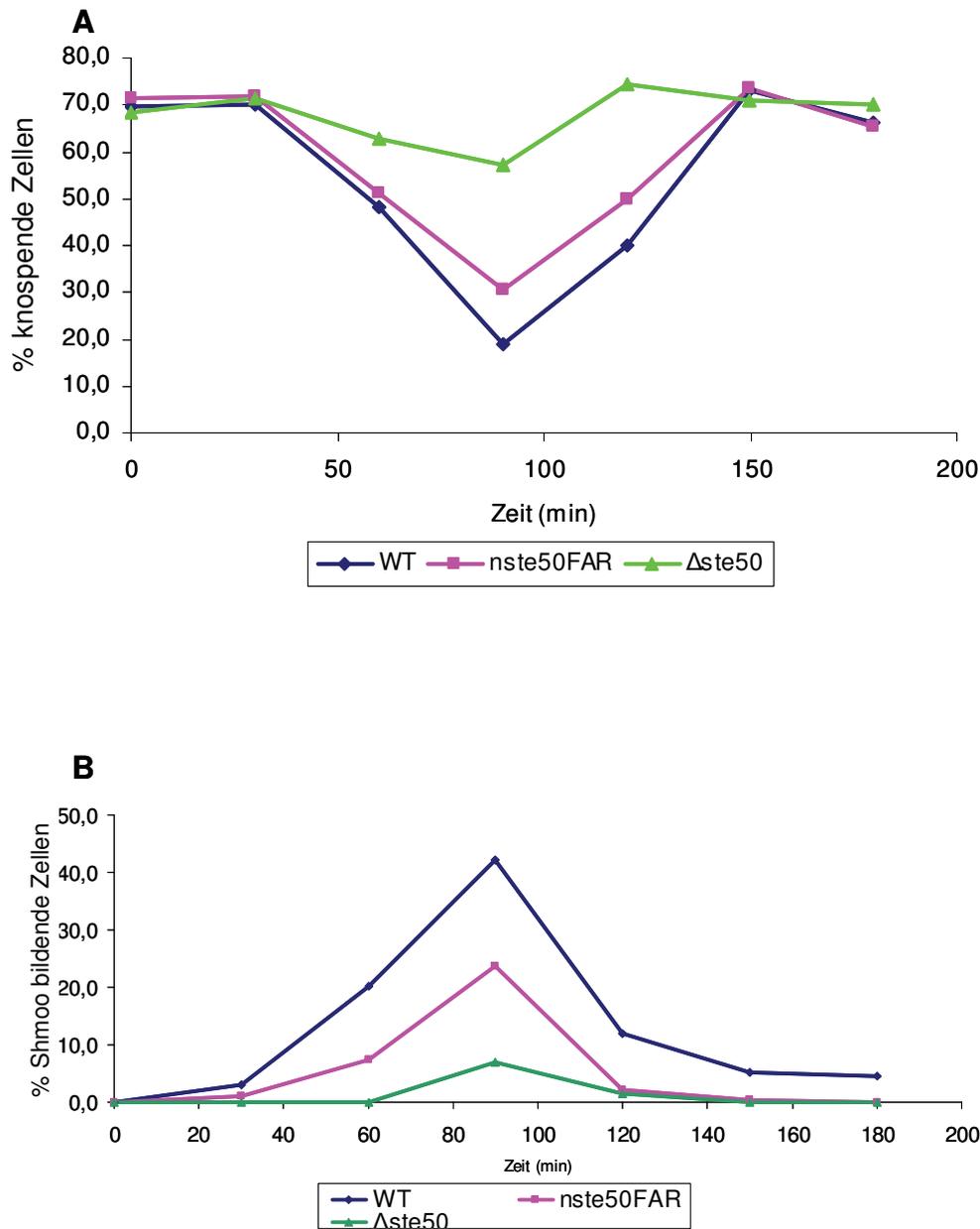
### 3.3.3.3 Untersuchungen zu morphologischen Veränderungen und dem G1-Zellzyklus-Arrest nach Induktion mit $\alpha$ -Faktor

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass *nste50FAR* zu einer schwächeren Aktivierung von *FUS1-lacZ* führt. Es soll nun untersucht werden, ob sich dies auch in der Bildung von Shmoo widerspiegelt. Dafür wurden Zellen der Stämme W303-1A, *W303-1A Myc-nste50FAR* und *W303-1A  $\Delta$ ste50* in Flüssigkultur logarithmisch angezogen und mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor induziert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen und auf die Bildung von Shmoos (Paarungsfortsätze) sowie nach nicht knospenden Zellen - anhand des prozentualen Anteils von knospenden zu nicht knospenden Zellen (Buddingindex), was das Ausmaß des induzierten G1-Arrest durch die Pheromonbehandlung reflektiert - untersucht.

Alle Stämme zeigen den gleichen Anteil an knospenden Zellen im vegetativen Wachstum (Abbildung 3.22 A). Im  *$\Delta$ ste50* Mutationsstamm sinkt der Anteil an knospenden Zellen durch Zugabe von Pheromen von 70% auf 60% innerhalb von 90 Minuten, um anschließend nach 120 Minuten wieder auf 70% zu steigen. Der Wildtypstamm hingegen hat nach 90 Minuten nur noch einen Anteil von 20% knospenden Zellen. Aber auch hier steigt durch die Adaption an das Pheromon der Anteil innerhalb von 150 Minuten auf den Ausgangswert zurück. Die *nste50FAR* Mutante zeigt einen geringeren Anteil an nicht knospenden Zellen. Die Adaption an das Paarungspheromon erfolgt jedoch im selben Zeitraum wie die des Wildtyps (Abbildung 3.22 A).

Der Shmoo-Index zeigt deutlichere Unterschiede als der Buddingindex (Abbildung 3.22 B). Im *STE50* Deletionsstamm sind weniger als 10% der Zellen in der Lage Shmoo zu bilden. Im Wildtyp hingegen zeigen nach 90 Minuten 40% der Zellen einen oder mehrere Shmoo. Die Mutante *nste50FAR* weist sogar eine um die Hälfte verringerte Anzahl an Shmoo auf, die sich nach 120 Minuten fast vollständig wieder zurückbilden (Abbildung 3.22 B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einfluss von *nste50FAR* auf den Peromonantwortweg sich im Buddingindex nicht so deutlich zeigt, wie im Shmooindex. Die Adaptionsrate an das Paarungspheromon ist durch die Expression von *nSte50FAR* anstelle von *Ste50* nicht beeinflusst.



**Abbildung 3.22 Auswirkung von integriertem nste50FAR auf morphologische Veränderungen und G1-Arrest nach Zugabe von Paarungspheromon**

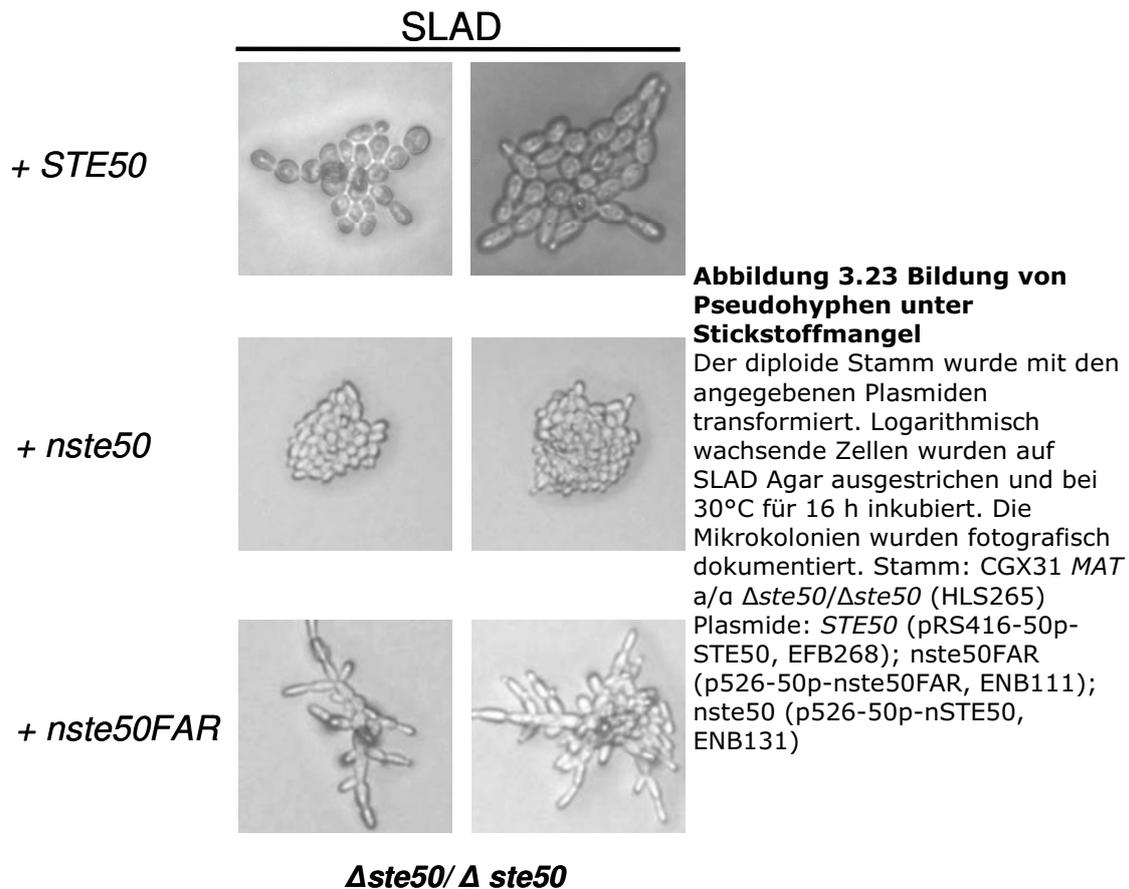
Die angegebenen Stämme wurden in flüssigem Minimalmedium angezogen. Die Zellen wurden aus einer Übernachtskultur in frischem Medium angeimpft und zu einer logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Dann wurde  $\alpha$ -Faktor zu einer Endkonzentration von  $1 \mu\text{M}$  gegeben. Es wurden Proben entnommen und die Zellen fixiert. Die Anzahl an Zellen im G1-Arrest (**A Buddingindex**) und Shmoo bildende Zellen (**B Shmoo-index**) wurden mikroskopisch bestimmt. Die Werte werden in % der gesamten Zellzahl angegeben. Es wurden für jeden Zeitpunkt mindestens 200 Zellen ausgezählt. Stämme:  $\Delta ste50$  (W303-1A  $\Delta ste50$ , HFB93); WT (W303-1A, HGX10); nste50FAR (W303-1A *Myc-nste50FAR*, HNB165)

### 3.3.4 Untersuchungen zur Funktion von plasmamembran-rekrutiertem Ste50-ΔRAD im filamentösen Wachstumsweg

Die RA-Domäne von Ste50 vermittelt die Interaktion mit den kleinen G-Proteinen Cdc42 und Ras. In diesem Versuchsteil soll untersucht werden wie sich *nste50FAR* im Vergleich zu wildtypischen Ste50 auf den filamentösen Wachstumsweg auswirkt. So lassen sich vielleicht Rückschlüsse auf die Rolle der RA Domäne und auf die Funktion von Ste50 in diesem Signalweg schließen. Eine Deletion der RA-Domäne führt zu einem Funktionsverlust von Ste50 in diesem Signalweg. Um herauszufinden wie sich *nste50FAR* auf den Signalweg auswirkt, soll die Bildung von Pseudohyphen in diploiden Zellen untersucht werden. Da haploide Zellen unter Glukosemangel invasives Wachstum und verstärkte Expression des Adhesins Flo11 zeigen, soll untersucht werden, wie sich *nste50FAR* darauf auswirkt. Die Expression von *FLO11-lacZ* wird als Reporter benutzt. In dieser Arbeit werden die haploiden Zellen in Minimalmedium angezogen und die Expression von *FLO11-lacZ* und dem *FG(TyA)-lacZ* Reporter nachdem die Glukose im Medium verbraucht ist, gemessen. Diese Methode erreicht höhere Aktivitäten als die Anzucht in SLAD Medium, also unter Mangel von Stickstoff. Zusätzlich soll die Auswirkung einer *STE50* Deletion auf den filamentösen Wachstumsweg bei einer *Ras2<sup>val19</sup>* oder *Tpk2* Überexpression untersucht werden, um die Rolle von Ste50 im filamentösen Wachstumsweg weiter aufzuklären.

#### 3.3.4.1 Induktion von pseudohyphalem Wachstum in diploiden Zellen

In *Saccharomyces cerevisiae* besitzen diploide Zellen die Fähigkeit, von normalem vegetativen Wachstum zu einem pseudohyphalen Wachstum zu wechseln. Der auslösende Reiz ist Stickstoffmangel im Medium. Für die Induktion von Pseudohyphenbildung sind sowohl der Ras/cAMP Weg und der MAPK-Signalweg erforderlich (Mösch *et al.*, 1999). Zur Induktion von pseudohyphalem Wachstum werden die Zellen auf Minimalmedium mit wenig Stickstoff (SLAD) angezogen. Hierfür wurde ein diploider Stamm mit einer  $\Delta ste50/\Delta ste50$  Mutation mit den Plasmiden pRS416-50p-STE50, p526-50p-nste50FAR und , pRS416-50p-nSTE50 transformiert. Die Zellen wurden auf SLAD-Agar ausgebracht und die Mikrokolonien nach 16 Stunden untersucht.



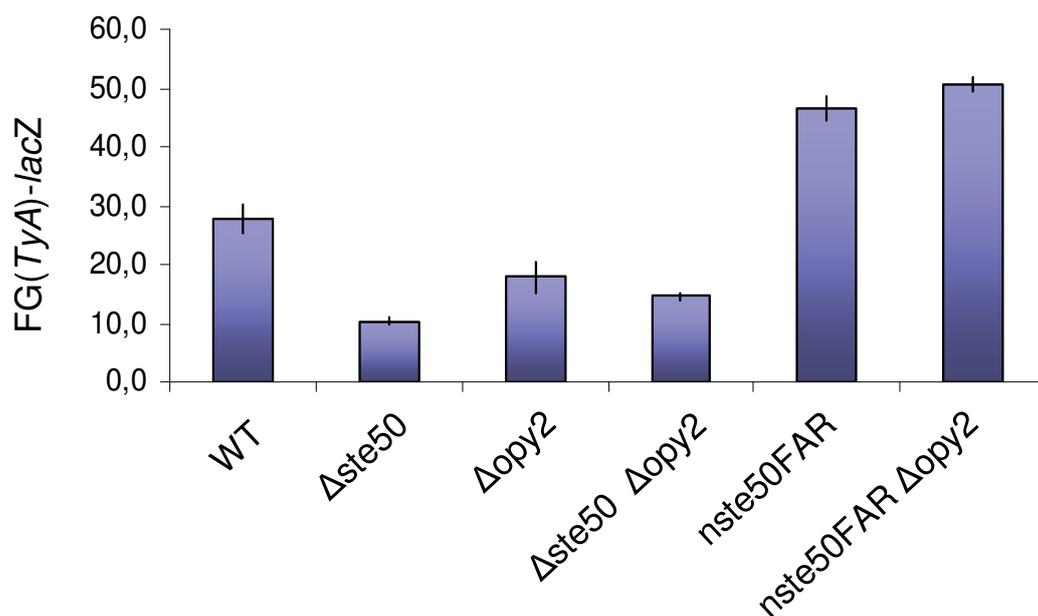
Es zeigt sich, dass die Expression von wildtypischen *Ste50* die Bildung von Pseudohyphen ermöglicht (Abbildung ). Zellen, die *nSte50* (AA 1-252) ohne eine Membranrekrutierung exprimieren, bilden keine Pseudohyphen in SLAD Medium aus. Die Zellen zeigen normales vegetatives Wachstum. Die Expression von *nste50FAR* hingegen, weist eine stärkere Bildung von Pseudohyphen auf als bei *Ste50*. Die Zellen sind deutlich elongiert (Abbildung 3.23).

Es lässt sich daher schließen, dass membranrekrutiertes *nSte50* die Bildung von Pseudohyphen verstärkt einleitet.

### 3.3.4.2 Auswirkung von membranrekrutiertem *nste50FAR* auf die Transkription des Reportergens *FG(TyA)-lacZ*

Der filamentöse Wachstumsweg wird sowohl von dem Ras/cAMP Weg als auch durch den MAPK-Signalweg reguliert. Eine Deletion von *STE50* unterbricht den MAPK-Signalweg, wobei der filamentöse Wachstumsweg gestört ist. Die Auswirkung von *nste50FAR* auf den Signalweg soll mittels der Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* untersucht werden. Bei *FG(TyA)-lacZ* handelt es sich um eine Fusion des Ty1-Transposons mit der  $\beta$ -Galaktosidase. Seine Expression ist abhängig von den Transkriptionsfaktoren Ste12 und Tec1 des MAPK-Signalwegs (Laloux *et al.*, 1994, Madhani & Fink 1997) und wird durch Stickstoffmangel induziert. Die Aktivierung läuft über den Kss1 MAPK-Signalweg.

Verschiedene Stammhintergründe wurden mit dem Reportergen *FG(TyA)-lacZ* transformiert. Die Transformanden wurden logarithmisch in Minimalmedium angezogen und dann zur Induktion des Signalwegs für 8 h in SLAD (Stickstoffmangel) inkubiert. Aus



**Abbildung 3.24 Messung der *FG(TyA)-lacZ* Aktivität unter Stickstoffmangel**

Reportergenanalyse der Expression von *FG(TyA)-lacZ*. Verschiedene Stammhintergründe wurden mit dem Reportergen transformiert. Logarithmisch wachsende Zellen wurden in SLAD Medium für 8 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet und Rohextrakte hergestellt. Die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase wurde mit Hilfe eines Enzymtests ermittelt. Die angegebenen Werte sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen. Stämme: WT (W303-1A, HGX10);  $\Delta ste50$  (W303-1A  $\Delta ste50$ , HFB93);  $\Delta opy2$  (W303-1A  $\Delta opy2$ , HNB210);  $\Delta ste50 \Delta opy2$  (W303-1A  $\Delta ste50 \Delta opy2$ , HNB212); *nste50FAR* (W303-1A Myc-*nste50FAR*, HNB165); *nste50FAR*  $\Delta opy2$  (W303-1A Myc-*nste50FAR*  $\Delta opy2$ , HNB216); Plasmid: *FG(TyA)-lacZ* (pFG(TyA)-lacZ, EFB309)

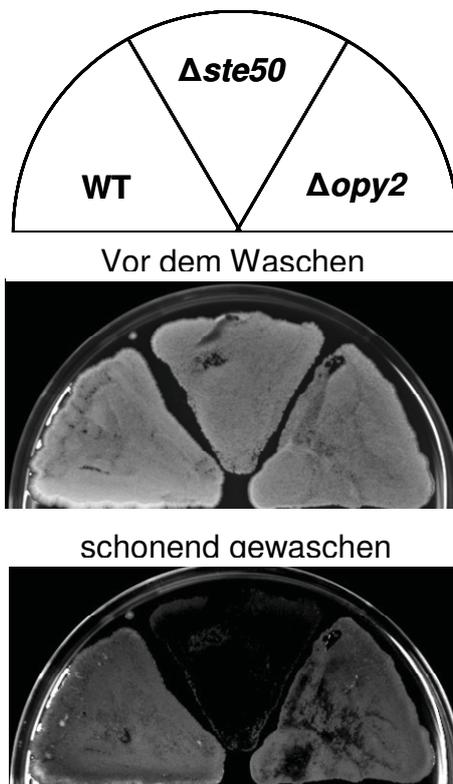
den geernteten Zellen wurden Rohextrakte hergestellt und die *FG(TyA)-lacZ* Aktivität mittels eines ONPG Enzymtests ermittelt.

Es zeigt sich, dass die Expression des Reportergens *FG(TyA)-lacZ* durch Expression von *nSte50FAR* gesteigert werden kann (Abbildung 3.24). Alleine der Wildtypstamm zeigt eine Aktivierung der Expression des Reportergens (28 mUnits). Werden die Zellen in Vollmedium angezogen, so kommt es zu einer minimalen Expression des *FG(TyA)-lacZ* Reportergens (3 mUnits, Daten nicht gezeigt). Wird *STE50* deletiert, so sinkt die Aktivierung um den Faktor 3. Da in vorherigen Experimenten eine Auswirkung von *OPY2* auf die Pheromonantwort festgestellt werden konnte, wurde dieser  $\Delta$ *opy2* Stamm auf die Expression von *FG(TyA)-lacZ* unter Stickstoffmangel untersucht. Es zeigt sich hierbei ein Rückgang der Expression von *FG(TyA)-lacZ* um 35%. Die Doppeldelation  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *opy2* verhält sich wie eine *STE50* Einzeldelation. Im diploiden Stamm wurde durch *nSte50FAR* verstärktes Pseudohyphales Wachstum induziert. Einen ähnlichen Effekt erhält man auch bei der Expression von *FG(TyA)-lacZ* in einem haploiden Stammhintergrund. Die Expression ist um den Faktor 1,7 verstärkt. Eine zusätzlich Deletion von *OPY2* bewirkt keine Veränderung in der *FG(TyA)-lacZ* Expression (Abbildung 3.24).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *nste50FAR* Mutante einen positiven Einfluss auf die *FG(TyA)-lacZ* Expression hat.

### **3.3.4.3 Eine *OPY2* Deletion hat keinen Einfluss auf die Adhäsion von haploiden Zellen**

In dem vorherigen Versuchsteil konnte gezeigt werden, dass *Opy2* die Induktion eines Reportergens im pseudohyphalen Antwortweg beeinflusst. Eine Deletion von *OPY2* führt zu einer Abschwächung der *FG(TyA)-lacZ* Reporteraktivität. Um zu überprüfen, ob sich diese veränderte MAPK-Signalaktivität auch phänotypisch darstellt, wurde die Auswirkung einer *OPY2* Deletion auf das adhäsive Wachstum getestet. Die Zell-Zell und Zell-Oberfläche Adhäsion ist ein wichtiger Bestandteil des haploiden invasiven Wachstums und der diploiden Pseudohyphen. Die wichtige morphologische Veränderung wird durch Kohlenstoff- bzw. Stickstoffmangel ausgelöst und benötigt das Oberflächenprotein Flo11. Um zu testen ob *Opy2* die Adhäsion beeinflusst, wurde *OPY2* deletiert. Der wildtypische Stamm zeigt sowohl Adhäsion als auch invasives Wachstum. Die Stämme wurden auf Vollmedium ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Bevor nicht adhäsive Zellen mit Wasser abgespült wurden, wurde das gesamte Wachstum fotografisch dokumentiert (Abbildung 3.25).



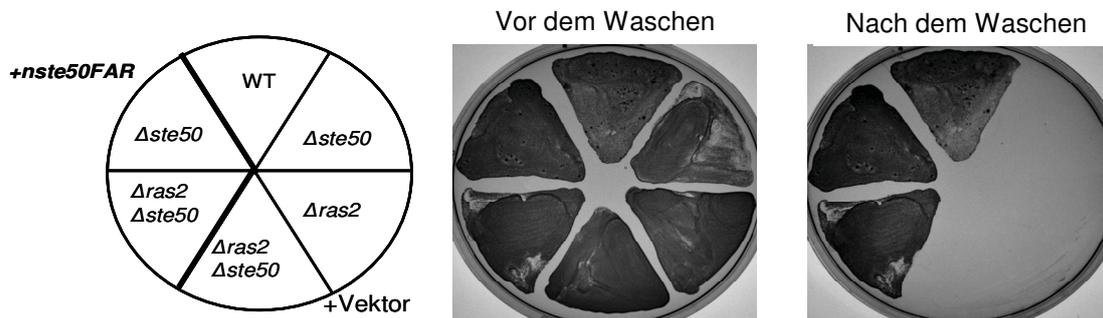
**Abbildung 3.25 Auswirkung einer *OPY2* Deletion auf die Adhäsion von haploiden Zellen**

Die angegebenen Stämme wurden in minimal Medium angezogen und von einer Übernachtskultur auf ein YPD Platten ausgestrichen. Die Platten wurden für 3 Tage inkubiert und das gesamte Wachstum festgehalten. Dann wurden nicht adhäsive Zellen abgewaschen und die Adhäsion wiederum festgehalten. Stämme: WT (MR12 *MAT a*, HF750);  $\Delta ste50$  (HGH848);  $\Delta opy2$  (HNB287)

Es ist zu sehen, dass die Deletion von *OPY2* keinen Einfluss auf die Adhäsion hat. Der Stamm zeigt das gleiche Verhalten wie der Wildtypstamm. Eine  $\Delta ste50$  Mutante wurde als Negativkontrolle verwendet und zeigt keine Adhäsion.

#### 3.3.4.4 Eigenschaften von *nste50FAR* in der Adhäsion haploider Zellen

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass *nste50FAR* zu einer Erhöhung des Expressionslevels von *FG(TyA)-lacZ* führt. Die RA-Domäne von Ste50 vermittelt die Interaktion zu den kleinen G-Proteinen Ras1 und Ras2. Ras2 spielt eine wichtige Rolle im invasiven Wachstumsweg, und dies nicht nur im RAS/cAMP Weg, sondern auch im Ste50-MAPK-Signalweg. Ras2 wird oberhalb von Ste50 in diesem Weg eingeordnet (Mösch *et al.*, 1999). Es besteht daher die Möglichkeit, dass Ras2 Ste50 rekrutiert. Es galt nun zu testen, ob *nste50FAR* eine *RAS2* Deletion komplementieren kann. Um dies zu überprüfen wurden  $\Delta ste50$ ,  $\Delta ras2$  und  $\Delta ras2 \Delta ste50$  Stämme mit Leervektor als Negativkontrolle oder p526-50p-*nSTE50FAR* (*nste50FAR* auf einem CEN Plasmid kodiert unter der Kontrolle des *STE50* Promotors) transformiert. Die Transformanten wurden auf Selektivmedium ausgestrichen und bei 30°C inkubiert.



### Abbildung 3.26 Auswirkung plasmamembranrekrutiertem nSte50 auf die Adhäsion von haploiden Zellen

Die angegebenen Stämme wurden mit p526-50p-nSTE50FAR oder pGREG526 transformiert. Die Transformanten wurden in minimal Medium angezogen und von einer Übernachtskultur auf SD Platten ausgestrichen. Die Platten wurden für 2 Tage inkubiert und das Gesamtwachstum photographisch dokumentiert. Anschließend wurden nicht adhäsive Zellen abgewaschen und die Adhäsion wiederum festgehalten. Stämme: WT (HF750);  $\Delta ste50$  (HGH848);  $\Delta ras2$  (HSK267),  $\Delta ras2 \Delta ste50$  (HSK256); Plasmide: *nste50FAR* (p526-50p-nste50FAR, ENB111); Vektor (pGREG526, EWK75)

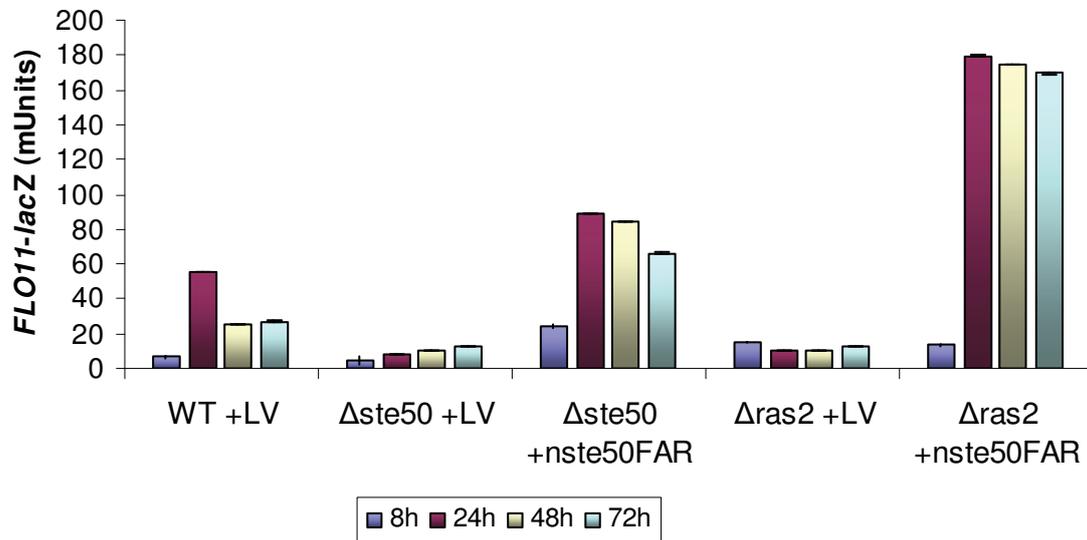
In Abbildung 3.26 ist zu sehen, dass die Expression von *nste50FAR* zur Adhäsion führt. Der MR12 Wildtypstamm wurde als Positivkontrolle verwendet und zeigt ebenfalls Adhäsion. Die Deletion von *STE50* oder *RAS2* unterbricht die MAPK-Signalweiterleitung und führt daher zum Verlust der Adhäsion. Eine Doppeldeletion zeigt keinen weiteren Effekt. Eine Expression von *nste50FAR* unter Kontrolle des Eigenpromotors führt zu einer vollständigen Wiederherstellung der Adhäsion in einer  $\Delta ste50$  Mutante. Außerdem wird eine *RAS2* Deletion vollständig durch membranrekrutiertes Ste50- $\Delta$ RA komplementiert. Die Zellen zeigen wildtypisches adhäsives Wachstum (Abbildung 3.26).

#### 3.3.4.5 *nste50FAR* führt zu einer verstärkten Expression des Reportergens *FLO11-lacZ* in stationären Zellen

Das invasive Wachstum und das pseudohyphale Wachstum sind Sonderformen des normalen vegetativen Wachstums von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Zellen adaptieren sich anhand dieser Wachstumsformen an Veränderungen des sie umgebenden Milieus - insbesondere löst eine Verknappung von Nährstoffen solche Wachstumsveränderungen aus. Beide Wachstumsformen sind abhängig von der Expression des Zellwand assoziierten Glykoproteins Flo11. Das Level der Aktivierung der Transkription von *FLO11* ist abhängig von der Stärke des Signals. Eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst die Transkription von *FLO11*. Ein wichtiger Regulator ist der Ste50-MAPK-Signalweg. Um zu untersuchen, wie sich *nste50FAR* auf die Expression von Flo11 auswirkt, wurde ein

*FLO11-lacZ* Reporter gen verwendet. Die verwendeten MR12 Stämme besitzen ein integriertes *FLO11-lacZ* Reporter gen (Rottmann *et al.*, 2003).

Um die Aktivierung von *FLO11-lacZ* zu messen, wurden die Stämme in flüssigem



**Abbildung 3.27 Auswirkung von plasmamembranrekrutiertem nSte50FAR auf die *FLO11-LacZ* Expression**

Die angegebenen Stämme wurden mit p526-50p-nSTE50FAR oder pGREG526 transformiert. Die Transformanden wurden in flüssigen Minimalmedium mit Galaktose angezogen, um die Expression zu induzieren. Die Transformanden wurden bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert und Proben für eine LacZ Aktivitätsbestimmung an den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Zellen wurden geerntet und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in den Rohextrakten wurde bestimmt. Es wurde mittels der Proteingehamtmenge die spezifischen Aktivität berechnet. Die Daten zeigen den Mittelwert zweier unabhängiger Messungen. Stämme: WT (HF 750);  $\Delta ste50$  (HGH848);  $\Delta ras2$  (HSK267); Plasmide: *nste50FAR* (p526-50p-nste50FAR, ENB111); LV (pGREG526, EWK75)

Minimalmedium angezogen. Nach 8 Stunden wurden Proben für logarithmisch wachsende Zellen genommen und nach 24, 48 und 72 Stunden Proben für Zellen in der stationären Phase. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Level der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität mit einem ONPG Enzymtest bestimmt.

Es zeigt sich, dass logarithmisch wachsende Zellen eines Wildtypstammes eine sehr geringe basale *FLO11-lacZ* Expression zeigen (Abbildung 3.27). Nach 24 Stunden erreicht die Expression des Reporter gens das höchste Niveau und sinkt in den nächsten 48 Stunden wieder um die Hälfte. Wird jedoch der MAPK-Signalweg unterbrochen, entweder durch die Deletion von *STE50* oder die Deletion des kleinen G-Proteins *RAS2*, so steigt die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase nicht über das basale Niveau, welches der Wildtypstamm im logarithmischen Wachstum zeigt (Abbildung 3.27). Jedoch ist das basale Level bei einer *RAS2* Deletion deutlich erhöht (17 mUnits). Im vorherigen

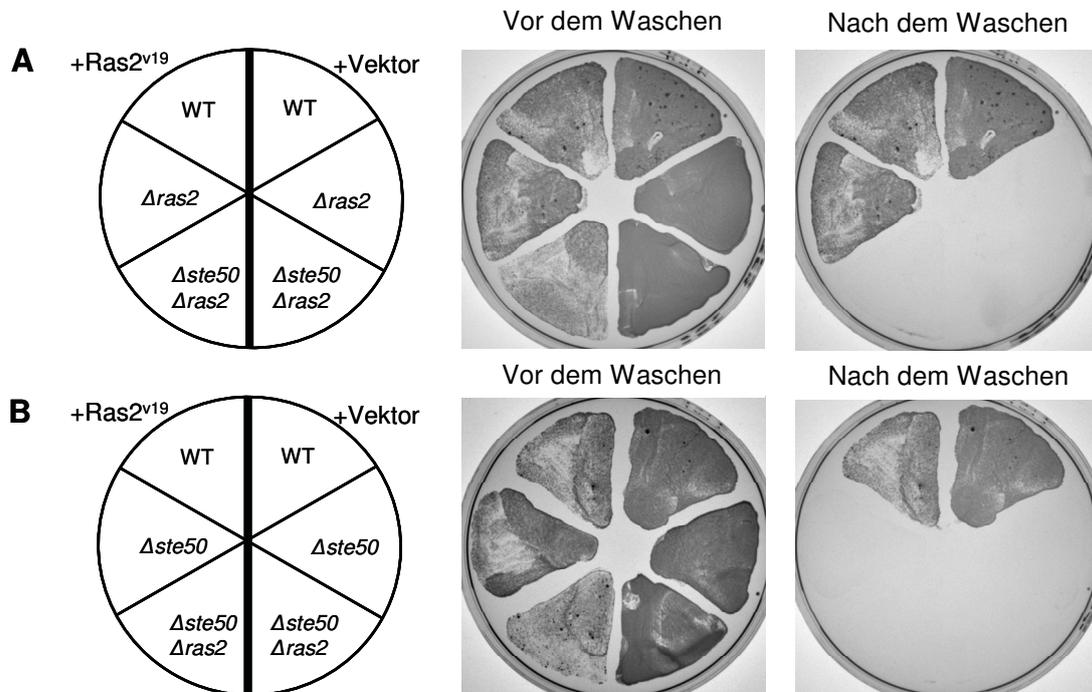
Experiment wurde gezeigt, dass die Expression von *nSte50FAR* die Adhäsion von  $\Delta ste50$  und  $\Delta ste50 \Delta ras2$  Mutanten wieder herstellen kann. Die Stämme wurden mit dem Plasmid p526-50p-*nste50FAR* transformiert und die *FLO11-lacZ* Expression untersucht: Das basale Level in logarithmisch wachsenden Zellen ist gegenüber dem Wildtyp von 9 mUnits auf 22 mUnits gestiegen. Es ist zu sehen, dass die Expression des Reportergens gegenüber dem Wildtyp nach 24h um den Faktor 1,4 auf 85 mUnits erhöht ist. Auch bleibt das Level der Expression nach 72h um den Faktor 2,1 erhöht gegenüber dem Wildtyp (Abbildung 3.27). In einem  $\Delta ras2$  Stamm ist die Aktivierung von *FLO11-lacZ* um den Faktor 2,5 gegenüber dem Wildtyp erhöht. Auch hier sinkt die Expression nach 72 Stunden deutlich geringer. Da dieser Effekt auch in einem  $\Delta ste50$  Stamm zu beobachten ist, scheint *nste50FAR* gegenüber *Ste50* dominant zu sein. Es ist auch zu sehen, dass in logarithmisch wachsenden Zellen das basale Expressionsniveau leicht erhöht ist wenn *nste50FAR* und *Ste50* vorhanden ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, das *nste50FAR* einen verstärkenden Einfluss auf die Expression von *FLO11-lacZ* hat. Dieser zeigt sich in logarithmisch wachsenden Zellen, die nicht den Signalweg induzieren, und noch stärker in Zellen der stationären Phase.

#### **3.3.4.6 Adhäsion von haploiden Zellen bei Überexpression von Hyperaktivem Ras2<sup>val19</sup>**

Das Protein Ras2 wird als oberste Komponente sowohl im Ras/cAMP Signalweg, als auch im Ste50-MAPK-Signalweg im invasivem Wachstum angesiedelt. Die aktivierte Form von Ras2 (Ras2-GTP) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bindet an die Adenylatzyklase und kontrolliert so den Ras/cAMP Weg. Auf welche Weise Ras2 den MAPK-Signalweg aktiviert und reguliert, ist bisher nicht geklärt. Eine hyperaktive Mutante von Ras2 ist Ras2<sup>val19</sup>. Diese Mutante kann das gebundene GTP nicht zu GDP abbauen, da die Mutante die GTPase-Aktivität unterdrückt. Ras2<sup>val19</sup> induziert den invasiven Wachstumsweg verstärkt (Mösch *et al.*, 1999). Diese Aktivierung ist abhängig von Ste12 und Tec1 (Mösch *et al.*, 1999). Es sollte geklärt werden, ob Ste50 für die Aktivierung durch Ras2<sup>val19</sup> benötigt wird. Hierfür wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt.

Verschiedene Stammhintergründe wurden mit einer Leervektorkontrolle oder mit dem Plasmid YCPRAS2val transformiert. Die Stämme wurden dann auf Minimalmedium ausgestrichen und die Platten für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden sowohl das gesamte Wachstum als auch das adhäsive Wachstum dokumentiert.



**Abbildung 3.28 Auswirkung einer Ras2<sup>val19</sup> Überexpression auf die Adhäsion von haploiden Zellen**

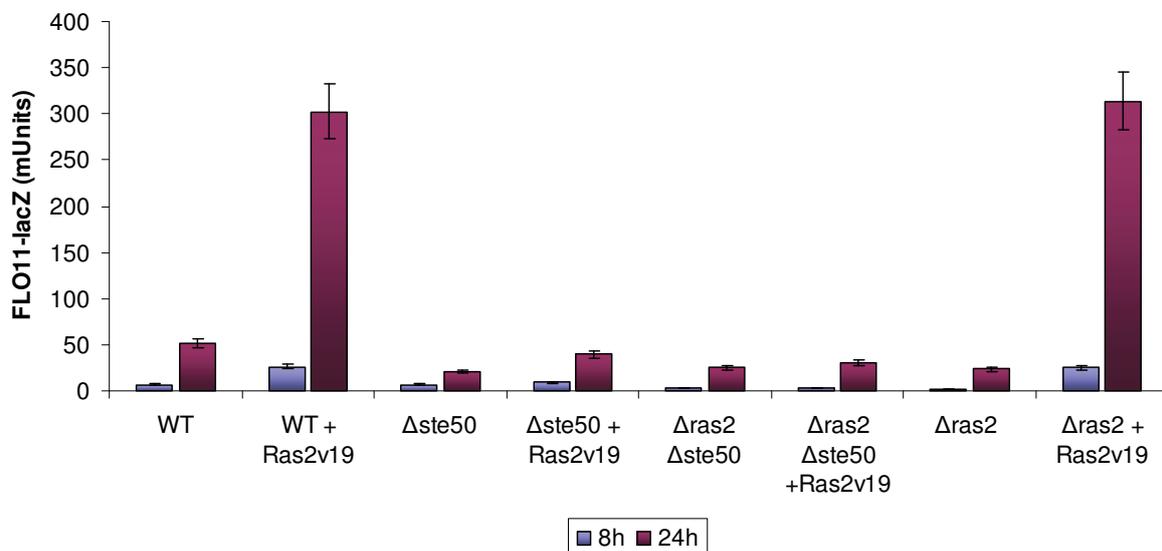
Die angegebenen Stämme wurden mit YCPRAS2val oder pGREG526 transformiert. Die Transformanten wurden in minimal Medium angezogen und von einer Übernachtskultur auf ein SD Platten ausgestrichen. Die Platten wurden für 2 Tage inkubiert und das Gesamtwachstum dokumentiert. Dann wurden nicht adhäsive Zellen abgewaschen und das Wachstum wiederum festgehalten. Stämme: WT (HFB750);  $\Delta ste50$  (HGH848);  $\Delta ras2$  (HSK267);  $\Delta ras2 \Delta ste50$  (HSK256); Plasmide: Ras2<sup>val19</sup> (YCPRAS2val, EGX156); Vektor (pGREG526, EWK75)

Hierbei zeigt sich, dass die Überexpression von Ras2<sup>val19</sup> durch das Plasmid YCPRAS2val den Adhäsionsverlust einer RAS2 Deletion komplementiert (Abbildung 3.28). Wird hingegen STE50 deletiert, so kann auch die Überexpression von Ras2<sup>val19</sup> keine Adhäsion vermitteln. Auch in einer  $\Delta ste50 \Delta ras2$  Doppelmutante wird der invasive Wachstumsweg durch das hyperaktive Ras2<sup>val19</sup> nicht wieder hergestellt. Zudem ist zu sehen, dass die Stämme die das Plasmid YCPRAS2val tragen, nicht so gut vegetativ wachsen - was durch das Gesamtwachstum dokumentiert ist. Diese Beobachtung wurde auch in Flüssigmedium nach Ras2<sup>val19</sup> Überexpression gemacht (Swiegers *et al.*, 2006).

### 3.3.4.7 Expression des Reportergens *FLO11-lacZ* in haploiden Zellen bei Überexpression von Hyperaktivem Ras2<sup>val19</sup>

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass hyperaktives Ras2 den invasiven Wachstumsweg in der Abwesenheit von Ste50 nicht aktivieren kann. Um dies auch auf biochemischem Weg nachzuweisen, wurde neben der phänotypischen Analyse die Expression des Proteins Flo11 untersucht (Rottmann *et al.*, 2003). Hierfür wurde ein *FLO11-lacZ* Reporter gen verwendet, bei welchem die  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des *FLO11* Promotors steht. Hierfür wurden Stämme mit integriertem *FLO11-lacZ* Reporter gen mit dem Plasmid YCPRAS2val transformiert und die Expression von *FLO11-lacZ* nach 8 bzw. 24 Stunden in flüssiger Kultur gemessen. Die Proben wurden anschließend geerntet und die Rohextrakte für die Messung der Enzymaktivität verwendet (Abbildung 3.29).

Es zeigt sich, dass die Überexpression des hyperaktiven Ras2<sup>val19</sup> zu einer Verstärkung der Expression um den Faktor 6 auf über 300 mUnits nach 24h zum Wildtyp Stamm führt. Aber auch bei logarithmisch wachsenden Zellen zeigt sich eine Erhöhung der



**Abbildung 3.29 Auswirkung einer Ras2<sup>val19</sup> Überexpression auf die *FLO11-lacZ* Expression**

Die angegebenen haploiden Stämme wurden mit YCPRAS2val oder pGREG526 transformiert. Die Transformanden wurden in flüssigen Minimalmedium mit Galaktose angezogen, um die Expression zu induzieren. Die Transformanden wurden bei 30°C für 24h unter ständigem Schütteln inkubiert und Proben für eine *lacZ* Aktivitätsbestimmung an den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Zellen wurden geerntet und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in den Rohextrakten wurde bestimmt. Mittels der Gesamtproteinmenge wurde die spezifischen Aktivität berechnet. Stämme: WT (HF750);  $\Delta ste50$  (HGH848);  $\Delta ras2$  (HSK267);  $\Delta ras2 \Delta ste50$  (HSK256); Plasmide: Ras2<sup>val19</sup> (YCPRAS2val, EGX156); LV (pGREG526, EWK75)

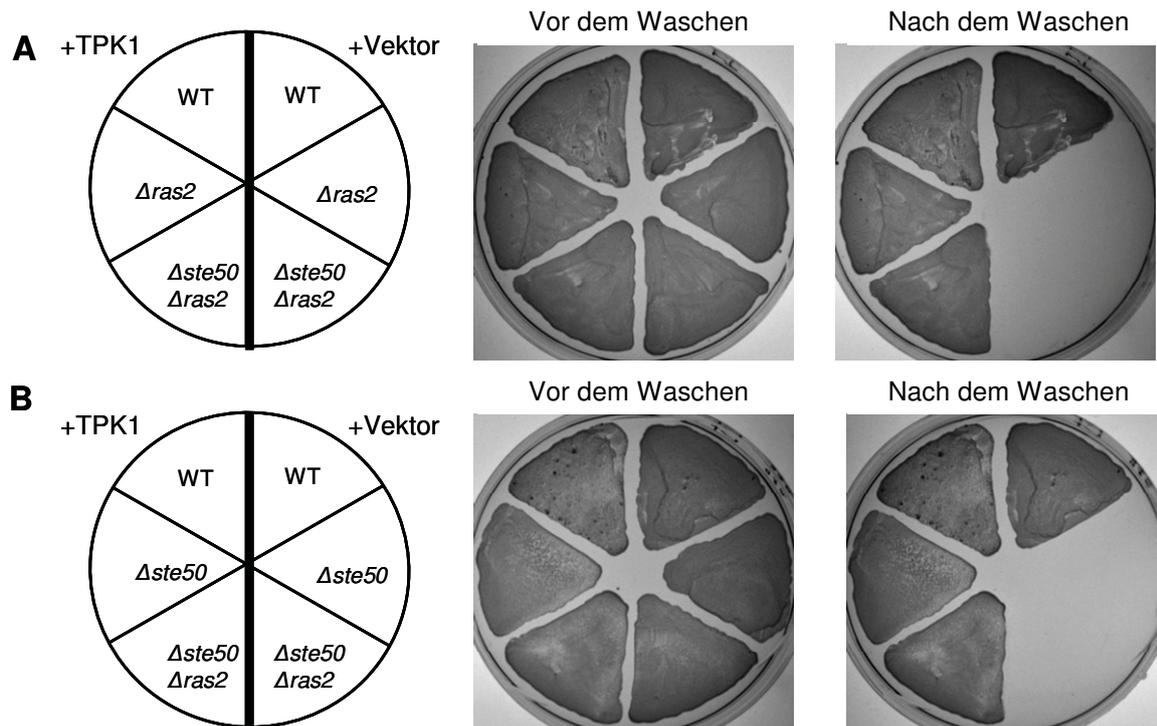
Reporteraktivität auf 24 mUnits durch die Überexpression von *FLO11-lacZ*. Eine Deletion von *RAS2* führt zu einer geringen Aktivierung der Expression, wird jedoch durch die Expression von *Ras2<sup>val19</sup>* komplementiert und die Expression des *FLO11-lacZ* Reportergens erhöht (Abbildung 3.29). Wird hingegen *STE50* deletiert, so verliert die Überexpression von *Ras2<sup>val19</sup>* ihre Wirkung. Die Deletion von *STE50* senkt die Expression gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 2. Eine Expression von *Ras2<sup>val19</sup>* in diesem Stammhintergrund führt nur zu einer leichten Steigerung der *FLO11-lacZ* Expression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der positive Einfluss von hyperaktivem *Ras2<sup>val19</sup>* auf die *FLO11-lacZ* Expression über *Ste50* vermittelt wird. Das Protein *Ste50* spielt eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung im invasiven Wachstumsweg. Würde hyperaktives *Ras2* die PKA über den cAMP-PKA Weg direkt aktivieren, so würde es zu einer Expression von *FLO11-lacZ* kommen. Eine Aktivierung der PKA durch Deletion von *BCY1* oder Überexpression von *TPK1-3* erhöht die Expression von *FLO11* über *Flo8* - unabhängig von *Tec1* oder *Ste12*, welche vom MAPK Signalweg reguliert werden (Pan & Heitman, 1999; Rupp *et al.*, 1999).

#### **3.3.4.8 Adhäsion von haploiden Zellen bei Überexpression der PKA Untereinheit Tpk1**

Der Ras/cAMP Signalweg ist wichtig für die Induktion des invasiven Wachstumswegs. Die PKA nimmt eine zentrale Rolle in diesem Signalweg ein. Es konnte gezeigt werden, dass Überexpression von Tpk Untereinheiten, also den katalytischen Untereinheiten der PKA, ein *RAS2* Deletion komplementieren kann, aber nicht die Deletion der Transkriptionsfaktoren *STE12* oder *TEC1* (Mösch *et al.*, 1999). Es wurde daher postuliert, dass es einen Crosstalk zwischen dem Ras/cAMP Signalweg und dem MAPK Signalweg gibt, und dieser Crosstalk auf Ebene der Transkriptionsfaktoren stattfindet. Ob Tpk1 *Ste50* für die Aktivierung benötigt, sollte mittels eines Adhäsionsassays überprüft werden.

Hierfür wurden die verwendeten Stämme entweder mit dem Plasmid *pcdc25/SUP/2* (multicopy *TPK1*) oder einem Leervektor transformiert. Die Transformanden wurden auf Minimalmedium ausgestrichen und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurde das Gesamtwachstum fotografiert. Nicht adhäsive Zellen wurden mit Wasser abgelöst und die Adhäsion dokumentiert.



### Abbildung 3.30 Auswirkung einer Tpk1 Überexpression auf das adhäsive Wachstum von haploiden Zellen

Die angegebenen haploiden Stämme wurden mit *pcdc25/SUP/2* (TPK1) oder *pGREG526* transformiert. Die Transformanten wurden in minimal Medium angezogen und von einer Übernachtskultur auf ein SD Platten ausgestrichen. Die Platten wurden für 2 Tage inkubiert und das Gesamtwachstum festgehalten. Dann wurden nicht adhäsiv wachsende Zellen abgewaschen und das Wachstum wiederum festgehalten. Stämme: WT (HF750);  $\Delta ste50$  (HGH848);  $\Delta ras2$  (HSK267);  $\Delta ras2 \Delta ste50$  (HSK 256); Plasmide: *TPK1* (*pcdc25/SUP/2*, EH999); Vektor (*pGREG526*, EWK75)

Es ist zu sehen, dass der Wildtypstamm adhäsives Wachstum zeigt (Abbildung 3.30). Die Stämme mit einer *RAS2*, *STE50* Deletion oder einer Doppeldeletion zeigen keine Adhäsion. Sind sie hingegen mit dem Plasmid *pcdc25/SUP/2* transformiert und die PKA Untereinheit Tpk1 wird überexprimiert, zeigt sich Adhäsion sowohl in den  $\Delta ras2$  und  $\Delta ste50$  Einzeldelationen als auch in der  $\Delta ste50 \Delta ras2$  Doppeldeletion. Zum Gesamtwachstum kann gesagt werden, dass Stämme mit einer Tpk1 Überexpression langsamer vegetativ wachsen als die Kontrollstämme.

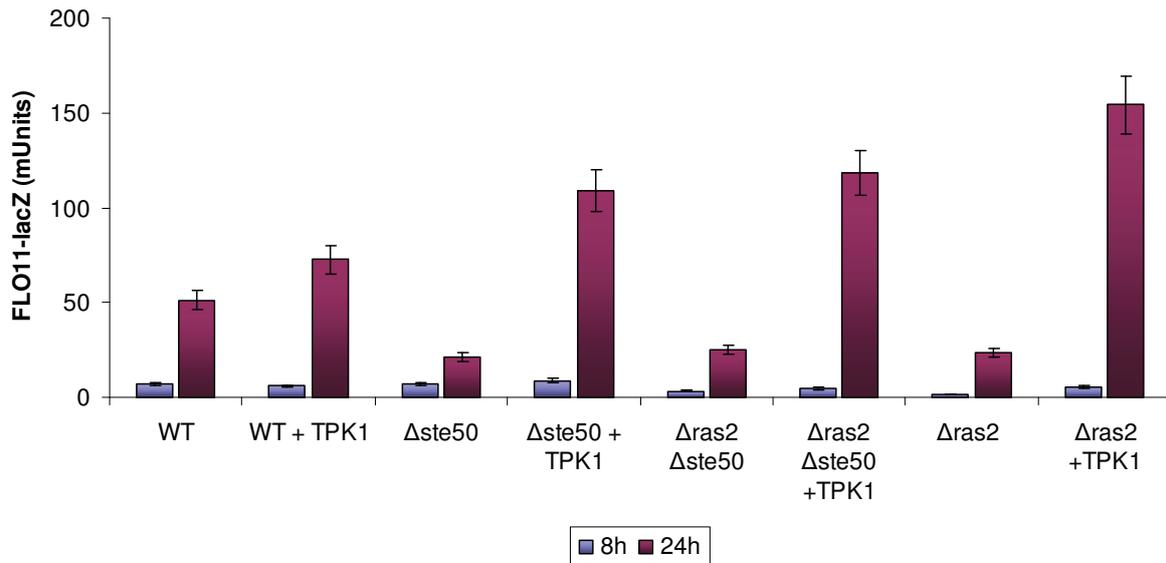
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von *TPK1* die Adhäsion unabhängig von Ste50 aktiviert.

### 3.3.4.9 Expression des Reportergens *FLO11-lacZ* in haploiden Zellen bei Überexpression der katalytischen PKA Untereinheit Tpk1

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der katalytischen Untereinheit der PKA Tpk1 den filamentösen Wachstumsweg aktivieren kann. Dies wird unabhängig von *RAS2* und *STE50* eingeleitet. Um dies zusätzlich zur phänotypischen Analyse zu überprüfen, sollte die Aktivierung der Transkription eines *FLO11-lacZ* Reportergens untersucht werden. Die katalytischen Untereinheiten der PKA aktivieren die Filamentation von diploiden Zellen unabhängig von Ste12 oder Tec1 (Pan & Heitman, 1999). Das Protein Flo11 vermittelt die Zell-Zell Adhäsion und auch die Zell-Substrat Adhäsion. Das Gen *FLO11* wird exprimiert in haploiden Zellen bei Glukosemangel und wird auch neben dem MAPK-Signalweg durch den Ras/cAMP Signalweg kontrolliert. Bei dem *FLO11-lacZ* Reporter gen liegt der *FLO11* Promotor vor dem Gen für die  $\beta$ -Galaktosidase. Dieses Reporter gen ist in die verwendeten Stämme integriert (Rottmann *et al.*, 2003).

Um die Expression des Reportergens zu messen, wurden die Stämme aus dem vorherigen Experiment in flüssigem Minimalmedium angezogen. Proben wurden nach 24 h für Zellen in der stationären Phase genommen. Die Zellen wurden aufgeschlossen und die Rohextrakte für eine Enzymaktivitätsmessung mit ONPG verwendet. Die Enzymaktivität wurde auf die Proteinkonzentration umgerechnet.

Es ist zu sehen, dass der Wildtyp nach 24 h eine  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität von 55 mUnits zeigt (Abbildung 3.31). Die Deletionen von *STE50* oder *RAS2* führen zu einem Verlust der *FLO11-lacZ* Expression um den Faktor 2. Eine Doppeldeletion beider Gene *Ste50* und *RAS2* hat keine zusätzliche Auswirkung. Eine Überexpression der katalytischen PKA Untereinheit Tpk1 führt zu einer erhöhten Aktivierung der *FLO11-lacZ* Reporter genexpression nach 24 h im Wildtyp um den Faktor 1,4. In logarithmisch wachsenden Zellen scheint eine Tpk1 Überexpression keinen Einfluss auf die *FLO11-lacZ* Expression zu haben, weder im WT noch in den Deletionsmutanten. In den Deletionsmutanten  $\Delta ste50$ ,  $\Delta ras2$  und  $\Delta ste50 \Delta ras2$  erhöht sich die *FLO11-lacZ* Expression nach 24 h im Vergleich zum Wildtyp auf etwa 115 mUnits. Hier ist das Expressionslevel um den Faktor 2,1 erhöht. Dieser Anstieg ist für alle drei Deletionsstämme zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass der Wildtypstamm die Aktivierung der *FLO11-lacZ* Expression durch TPK1 entgegenwirken kann. Ein solcher Mechanismus scheint bei den Deletionsstämmen nicht mehr aktiv zu sein.



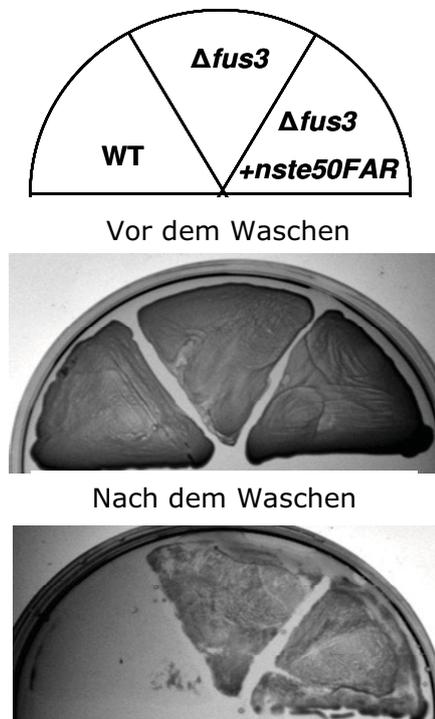
**Abbildung 3.31 Auswirkung einer Tpk1 Überexpression auf die *FLO11-lacZ* Expression**

Die angegebenen Stämme wurden mit *pcdc25/SUP/2* oder *pGREG526* transformiert. Die Transformanten wurden in flüssigen Minimalmedium mit Galaktose angezogen, um die Expression zu induzieren. Die Transformanten wurden bei 30°C unter ständigem Schütteln inkubiert und Proben für eine LacZ Aktivitätsbestimmung nach 24 Stunden entnommen. Die Zellen wurden geerntet und die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität in den Rohextrakten wurde bestimmt. Es wurde mittels der Gesamtmenge Protein die spezifischen Aktivität berechnet. Die dargestellten Daten wurden aus zwei unabhängigen Messungen gemittelt. Stämme: WT (HFB750);  $\Delta ste50$  (HGH848);  $\Delta ras2$  (HSK267);  $\Delta ras2 \Delta ste50$  (HSK 256); Plasmide: TPK1 (*pcdc25/SUP/2*, EHG99); Vektor (*pGREG526*, EWK75)

### 3.3.4.10 Der Ste50-MAPK-Signalweg, kann Adhäsion unabhängig von Flo8 vermitteln

Die Expression von *FLO11* wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt. Der wichtigste unter ihnen ist der Transkriptionsfaktor *FLO8*. Stämme, die kein Flo8 exprimieren, können nicht invasiv wachsen und zeigen keine Adhäsion (Liu *et al.*, 1996). *FLO11* besitzt einen der größten Promotorbereiche aller Gene in Hefe. Wichtige Transkriptionsfaktoren, die auf die Expression von *FLO11* Einfluss nehmen, sind Flo8 und der Ste12-Tec1 Komplex. Die Aktivität von Flo8 wird hauptsächlich vom PKA Signalweg gesteuert. Der MAPK Signalweg reguliert über das Protein Kss1 als spezifische Kinase die Transkriptionsfaktoren Ste12 und Tec1. Der entscheidende Transkriptionsfaktor Tec1 wird kontinuierlich in Abhängigkeit von Fus3 degradiert. Wird *FUS3* deletiert, so steigt die Tec1 Aktivität deutlich an. Um zu testen ob Adhäsion unabhängig von Flo8 möglich

ist, wurde *FUS3* im W303 Stammhintergrund deletiert. Die Stämme wurden dann auf Vollmedium ausplattiert und für 6 Tage bei 30°C inkubiert. Da *nste50FAR* den invasiven Wachstumsweg verstärkt einleitet, wurde zusätzlich das Plasmid p526-50p-nSTE50FAR transformiert.



**Abbildung 3.32 Auswirkung einer *FUS3* Deletion auf das adhäsive Wachstum in einem *flo8* Stamm**

Die angegebenen Stämme wurden in minimal Medium angezogen und von einer Übernachtskultur auf ein SD Platten ausgestrichen. Die Platten wurden für 6 Tage inkubiert und das Gesamtwachstum dokumentiert. Dann wurden nicht adhäsive Zellen schonend abgewaschen und photographisch festgehalten.  
 Stämme: WT (W303-1A, HGX10);  
 $\Delta fus3$  (W303-1A  $\Delta fus3$  HCH497 );  
 Plasmide: Vektor (pGREG526 EWK75); *nste50FAR* (p526-50p-*nste50FAR*, ENB111)

Es ist zu sehen, dass der W303-1A Wildtypstamm nach 6 Tagen keine Adhäsion zeigt (Abbildung 3.32). Wird nun *FUS3* deletiert, so zeigt sich Zell-Zell und Zell-Agar Adhäsion. Nach dem Waschschrift sind die Zellen nicht abgelöst. Die zusätzliche Expression von nSte50FAR hat keinen sichtbaren Einfluss auf die Adhäsion. Dies bedeutet, dass Fus3 negativ regulierend auf die Aktivierung der Adhäsion wirkt.

### 3.3.5 Lokalisierung von nSte50FAR während der Signaltransduktion

Ste50 ist in den Signaltransduktionswegen für die Paarung, das filamentöse Wachstum und der Antwort auf hyperosmolaren Stress involviert. Die membranrekrutierte Mutante nSte50FAR kann die Funktion von Ste50 in allen drei Signalwegen ganz oder teilweise komplementieren. Einige Proteine verändern unter signalinduzierenden Bedingungen ihre Lokalisierung in der Zelle. Dies kann auch für Ste50 gezeigt werden (Hopp, 2005). In diesem Versuchsteil soll die Verteilung von *nste50FAR* während der Signaltransduktion untersucht werden.

#### 3.3.5.1 Lokalisierung von GFP-nSte50FAR

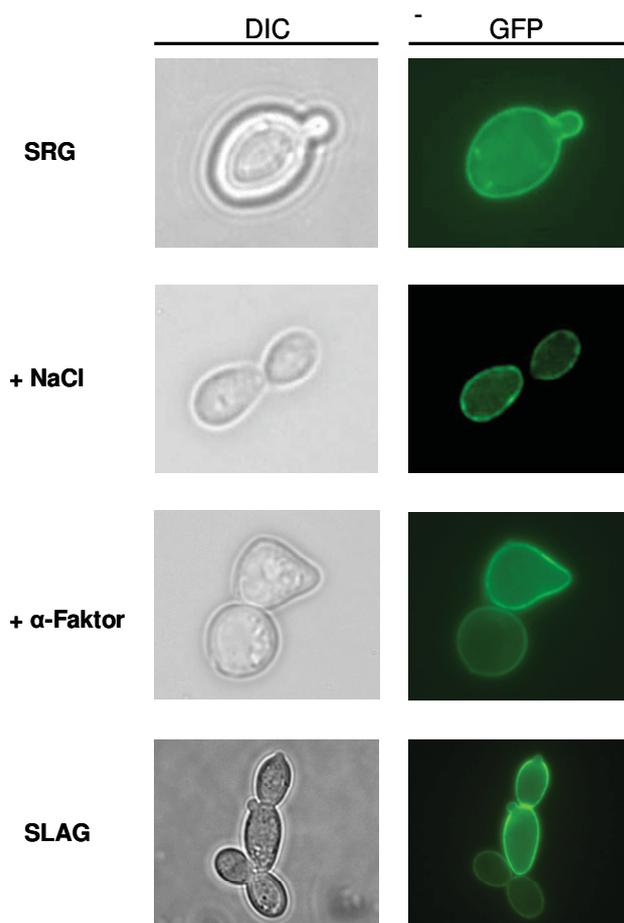
Um die Verteilungsmuster von *nste50FAR* während der Signaltransduktion zu untersuchen, sollte die Lokalisierung des Proteins in lebenden Zellen bestimmt werden. Für solche Untersuchungen eignen sich Fusionsproteine, bei denen das untersuchte Protein an das grün fluoreszierende Protein GFP fusioniert ist (Chalfie *et al.*, 1994). GFP wird durch die Bestrahlung mit Licht angeregt (Wellenlänge 395 nm), und gibt diese mit einer Eigenfluoreszenz im grünwelligen Bereich wieder ab. Diese kann mittels Filter mikroskopisch detektiert werden. Auf diese Weise können lebende Zellen untersucht werden.

Eine Fluoreszenzmikroskopie von Zellen, die GFP-nSte50FAR unter Kontrolle des *STE50* Eigenpromotor exprimieren, war nicht möglich, da keine Fluoreszenzsignale detektierbar waren. Die Zellen konnten jedoch unter Osmostress wachsen - was für ein funktionelles Fusionsprotein spricht. Für diesen Versuch wurden verschiedene Stämme mit dem Plasmid pGREG576-nSTE50FAR transformiert. Hier wird das GFP Fusionsprotein vom *GAL1* Promotor reguliert. Dies führt zur Überexpression des Proteins nSte50FAR, die jedoch keinen Einfluss auf das vegetative Wachstum der Zellen hat. Stämme wurden in SRG Medium logarithmisch angezogen und dann unterschiedlichen Stressen ausgesetzt. Für die Osmotoleranz wurden die Zellen für 5 Minuten mit 0,4 M NaCl inkubiert. Die Induktion der Paarung wurde mit 5  $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor für 90 Minuten erreicht. Das pseudohyphale Wachstum wiederum wurde durch 8-stündige Inkubation in SLAG-Medium ausgelöst.

In Abbildung 3.33 ist zu sehen, dass sich GFP-nSte50FAR hauptsächlich an der Zelloberfläche lokalisiert. Wie bei Ras2, dass durch eine Farnesylierung und Palmitoylierung zur inneren Seite der Plasmamembran rekrutiert wird (Dong *et al.*, 2003), zeigt nSte50FAR durch die 13 C-terminalen Aminosäuren von Ras2 eine Plasmamembran-Lokalisation. Bei logarithmisch wachsenden Zellen zeigt sich eine

gleichmäßige Färbung, die keine Strukturen hervorhebt oder Stellen von höherer Konzentration. Diese Färbung ändert sich, wenn die Zellen unter osmotischem Stress sind. Anstatt einer gleichmäßigen Färbung der Zelloberfläche, zeigen sich fleckenartige Strukturen in der Peripherie der Zelle bei der Verteilung des GFP-Fusionsproteins. Das Fusionsprotein GFP-nSte50FAR ist im HOG-Signalweg funktionell und vermittelt Osmotoleranz in einem  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Mutationsstamm (Daten nicht gezeigt). Wird der Pheromon-Antwortweg ausgelöst, so bilden Zellen mit GFP-nSte50FAR Shmoos aus, und gehen in den G1-Zellzyklus-Arrest. Die Verteilung des Proteins wird durch diesen Signalweg nicht beeinflusst (Abbildung 3.33). Es zeigt sich keine Akkumulierung von GFP-nSte50FAR an der Shmoospitze. Wird das pseudohyphale Wachstum durch Stickstoffmangel im Medium angeregt, elongieren die Zellen und bilden Pseudohyphen. Die Inkubation unter Stickstoffmangel hat keine Auswirkung auf die Lokalisierung des Fusionsproteins. Es ist unter diesen Bedingungen gleichmäßig an der Zelloberfläche lokalisiert (Abbildung 3.33).

Die beobachteten Ergebnisse bestätigen, dass das GFP-Protein an der Zelloberfläche



**Abbildung 3.33 Verteilung von GFP-nSte50FAR nach Signalinduktion**

Verschiedene Stämme wurden mit dem Plasmid pGREG576-*nste50FAR* transformiert. Die Transformanten wurden logarithmisch angezogen und nach Einleitung des jeweiligen Signalwegs beobachtet. Die Zellen wurden entweder für 5 Min mit 0,4 M NaCl, für 90min mit 5 $\mu$ M  $\alpha$ -Faktor oder für 8 h in SLAG Medium inkubiert. Die Lokalisierung des GFP-Proteins wurde mittels Fluoreszenz und DIC analysiert.

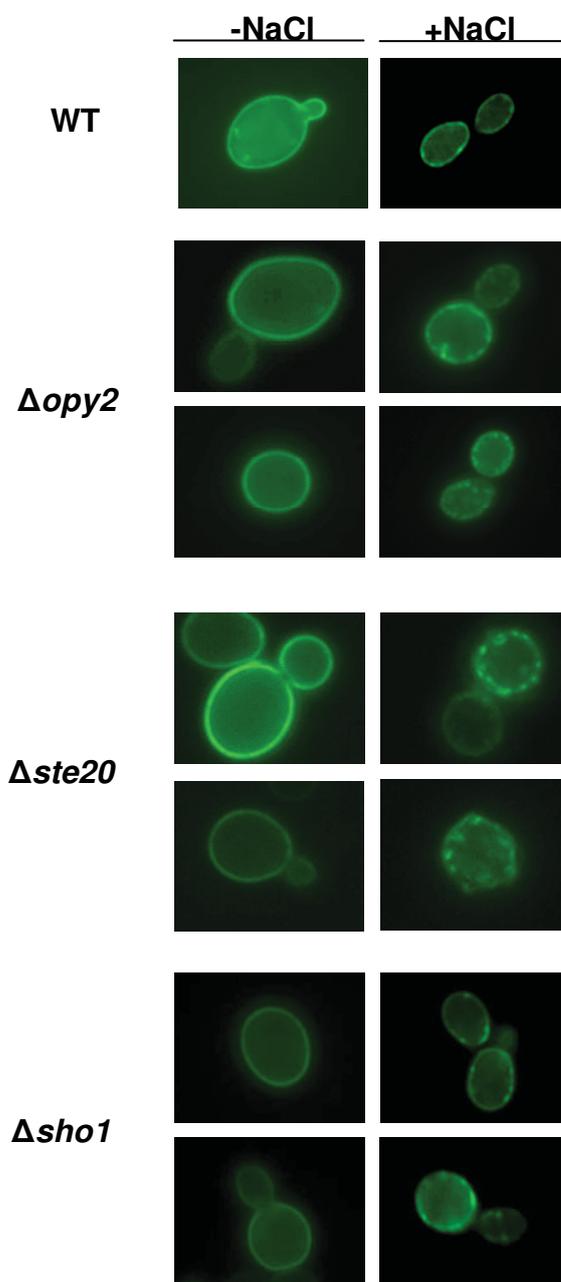
Stämme: SRG,  $\alpha$ -Faktor (WAM4, HFB93); NaCl (W303-1A  $\Delta ste50 \Delta ssk1$ , HCH100); SLAG (Cgx31 Mat a/ $\alpha \Delta ste50/\Delta ste50$  HLS256)

Plasmid: GFP-*nste50FAR* (pGREG576-*nste50FAR*, ENB130)

gleichmäßig lokalisiert ist und nur unter osmotischem Stress eine Veränderung in der Verteilung durch das Bilden von fleckenartigen Strukturen zeigt.

### 3.3.5.2 Verteilungsmuster von GFP-nSte50FAR bei osmotischem Stress an der Plasmamembran

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass sich das Verteilungsmuster von nSte50FAR unter osmotischem Druck ändert. Eine solche Veränderung wurde auch schon für andere Proteine, die am hochosmolaren MAPK-Signalweg beteiligt sind,



#### Abbildung 3.34 Verteilung von GFP-nSte50FAR nach Signalinduktion

Verschiedene Stämme wurden mit dem Plasmid pGREG576-*nste50FAR* transformiert. Die Transformanten wurden logarithmisch angezogen und nach Einleitung des jeweiligen Signalwegs beobachtet. Die Zellen wurden für 5 Min mit 0,4 M NaCl inkubiert. Die Lokalisierung des GFP-Proteins wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

Stämme: WT (W303-1A  $\Delta$ *ste50*  $\Delta$ *ssk1* HCH100);  $\Delta$ *ste20* (W303-1A  $\Delta$ *ste20*  $\Delta$ *ssk1*, HCH164);  $\Delta$ *sho1* (W303-1A  $\Delta$ *sho1*  $\Delta$ *ssk1*, HCH253),  $\Delta$ *opy2* (W303-1A  $\Delta$ *opy2*  $\Delta$ *ssk1*, HNB210) Plasmid: GFP-*nste50FAR* (pGREG576-*nste50FAR*, ENB130)

gezeigt. Sho1, ein Transmembranprotein, welches am HOG-Signalweg beteiligt ist, zeigt fleckenartige Strukturen unter Salzstress (Tatebayashi *et al.*, 2007). Es soll nun untersucht werden, ob vielleicht andere Proteine diese Veränderung vermitteln. Wenn es eine solche Beeinflussung geben sollte, so müsste sie von Proteinen vermittelt werden, die oberhalb von Ste50 im Signalweg angesiedelt sind. Hierfür wurden die Gene *OPY2*, *SHO1* und *STE20* deletiert. Alle drei Genprodukte befinden sich im HOG-Signalweg oberhalb von Ste50 und die Genprodukte von *OPY2* und *SHO1* sind bekannte Interaktionspartner von Ste50. Die Deletion ihrer Gene führt zu einem Osmosensitivitätsphänotypen, wenn auch *SSK1* deletiert wird. Können sie eine Rolle in der Rekrutierung des Proteins zu solchen fleckenartigen Strukturen vermitteln? Auch diese Stämme wurden mit dem Plasmid pGREG576-nSTE50FAR transformiert. Die Transformanten wurden in SRG-Medium logarithmisch angezogen und der HOG-Signalweg wurde mit 0,4 M NaCl für 5 Minuten induziert. Die Verteilung des GFP Fusionsproteins wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie festgehalten.

Es ist zu sehen, dass unter normalen Bedingungen das Fusionsprotein gleichmäßig an der Zelloberfläche lokalisiert (Abbildung 3.34). Dies lässt sich für alle drei Deletionsstämme W303-1A  $\Delta ste20 \Delta ssk1$ , W303-1A  $\Delta sho1 \Delta ssk1$  und W303-1A  $\Delta opy2 \Delta ssk1$  aussagen und die WT Kontrolle sagen. Wird jedoch NaCl zu den Zellen gegeben, so bilden sich bei allen drei untersuchten Stämmen fleckenartige Strukturen an der Zelloberfläche wenn auch mit unterschiedlichem Muster. Bei einer Deletion von *OPY2* zeigen sich fleckenartige Strukturen an der Zelloberfläche. Diese ähneln stark denen, die bereits im vorherigen Abschnitt für den  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Stamm (HCH100) beschrieben wurden. Eine Deletion von *STE20* führt zu einer Veränderung der fleckenartigen Strukturen. So sind diese vergrößert sondern bilden fast ringartige Strukturen. Die Flecken sind zudem nicht so kompakt in Ihrer Struktur sondern etwas ungleichmäßig gefärbt. In einem Stamm mit einer *SHO1* Deletion sind die fleckenartigen Strukturen nach Zugabe von NaCl im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass es in allen drei untersuchten Stämmen es zu einer Bildung von fleckenartigen Strukturen von GFP-nSte50FAR nach hyperosmolarem Schock kommt. Die genaue Struktur dieser Flecken ist bei einer *STE20* Deletion gegenüber dem Wildtyp verändert.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Die RA-Domäne von Ste50 ist essentiell für die Funktion von Ste50 in mehreren MAPK-vermittelten Signalwegen

Zellen nutzen ein Netzwerk von Signalwegen, um äußere Stimuli zu detektieren, verarbeiten und schließlich darauf zu antworten. Dieses Netzwerk hat zwei grundlegend gegensätzliche Eigenschaften: Komplexität und Universalität. Die Komplexität entsteht hauptsächlich durch die Vielzahl von äußeren Reizen auf die eine Zelle reagieren muss, der eine beschränkte Anzahl an Komponenten und daher auch Signalwegen entgegensteht. Es ist nicht möglich für die Zelle jedem Signal einen eigenen Signalweg entgegen zu stellen. Es werden daher verschiedene Mechanismen genutzt, um Signale eindeutig weiter zu leiten.

Es ist daher erstaunlich, dass sich trotz der Komplexität des Systems, allgemeine Strukturen in der Evolution erhalten haben. Dies bedeutet, dass jeder Organismus diese Signalwege den eigenen Bedürfnissen anpassen konnte. Einer dieser Organismen ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. *S. cerevisiae* besitzt fünf Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) Signalwege (Herskowitz, 1995; Gustin *et al.*, 1998). An dem Signalweg zur Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums und der Osmotoleranz ist das hier untersuchte Protein Ste50 beteiligt. Außer Ste50 teilen sich diese Signalwege noch weitere Komponenten darunter das kleine G-Protein Cdc42, die PAK Ste20 und die MAPKKK Ste11. Aus der Teilung der Komponenten geht hervor, dass die Signalwege ein Netzwerk bilden. Das regulatorische Adaptorprotein Ste50 könnte aufgrund seiner Struktur als Verknüpfung zwischen Rezeptorassoziierten G-Protein Effektoren mit den MAPK-Signalmodulen dienen.

Ste50 hat eine dreiteilige Struktur, bestehend aus der N-terminalen SAM-Domäne (steril alpha motif), einer Serin/Threonin reichen Region in der Mitte des Proteins und am C-terminalen Ende eine RA-Domäne (Ras associate). Die SAM-Domäne vermittelt die Interaktion mit der SAM-Domäne der MAPKKK Ste11. Die so vermittelte Interaktion ist stabil und Ste50 reguliert so die wichtige MAPKKK Ste11. Die Struktur und Funktion der SAM Domänen konnte in den vergangenen Jahren aufgeklärt werden (Jansen *et al.*, 2001; Grimshaw *et al.*, 2004; Kwan *et al.*, 2004; Bhattacharjya *et al.*, 2004). Mittels Two-Hybrid-Analysen und biochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass es allein die SAM Domänen der beiden Proteine sind, die die Interaktion vermitteln (Jansen *et al.*, 2001). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Mutationen in der SAM Domäne die

Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 beeinflussen und dadurch die Signalweiterleitung in der Pheromonantwort, dem invasiven Wachstum und der Osmotoleranz stören (Jansen *et al.*, 2001).

Die carboxyterminale Region von Ste50, welche die RA-Domäne beinhaltet, ist für die Funktion des Proteins Ste50 in der Signalweiterleitung im Pheromonweg und im invasiven Wachstumsweg ebenso entscheidend wie in der hochosmolaren Antwort (Ramezani-Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Posas *et al.*, 1998). Die RA Domäne von Ste50 wurde mittels einer Sequenzhomologie mit dem Ras Effektor RAL/GDS identifiziert (Ponting & Benjamin 1996). Die RA Domäne von Ste50 vermittelt die Interaktion mit den kleinen G-Proteinen Ras1, Ras2 und Cdc42 (Spode, 2003; Hopp, 2005; Tatebayashi *et al.*, 2006).

Der Ras/cAMP Signalweg steht in Wechselwirkung mit den verschiedenen MAPK-Signalwegen. Diese Wechselwirkungen erfolgen auch auf der Ebene von Ste50 (Hopp, 2005). Ste50 interagiert mit den kleinen G-Proteinen Ras1 und Ras2, die auch direkt auf den MAPK-Signalweg einwirken. Ras2 ist an der Aktivierung des invasiven Wachstumswegs involviert (Abbildung 3.26). Ras1 hingegen scheint keine Funktion im invasiven Wachstum zu spielen, nimmt aber Einfluss auf den Pheromon-Antwortweg (Bühning & Ramezani Rad, unveröffentlichte Daten). In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Ras Proteine mit Ste50 über die RA-Domäne von Ste50, die im carboxyterminalen Bereich des Proteins liegt, interagieren (Abbildung 3.8; Hopp, 2005). Die RA-Domäne von Ste50 ist essentiell für die Signalweiterleitung sowohl in der Induktion der Pheromonantwort, dem invasiven Wachstum als auch in der Antwort auf hochosmolaren Stress. So weisen Mutanten mit einer C-terminalen Deletion von Ste50, ähnlich einer *STE50* Deletion, eine niedrigere Sensitivität gegenüber Paarungspheromon auf, und können nur mit einer stark reduzierten Effizienz von 0,2% des Wildtyps paaren (Ramezani-Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1999). Welche Rolle genau die RA-Domäne spielt und wie die Interaktion von Ste50 mit den kleinen G-Proteinen die Signalweiterleitung beeinflusst, konnte bisher nicht geklärt werden. In dieser Arbeit konnten drei Mutanten identifiziert werden, die nicht mit den kleinen G-Proteinen Ras1 und Ras2 interagieren. Diese Mutanten weisen auch einen Funktionsverlust in allen Signalwegen an denen Ste50 beteiligt ist. So zeigen *ste50<sup>P318L</sup>*, *ste50<sup>L322S</sup>* und *ste50<sup>R296G,N301S</sup>* eine verminderte Sensitivität gegenüber Pheromon, Verluste der Funktion im Hochosmolaren Antwortweg und in der Induktion des invasiven Wachstumswegs auf. Die Mutation *ste50-N301S* phenokopiert das wildtyp Protein Ste50. Es kann daher angenommen werden, dass diese Mutation eine stille Mutation ist, also keine Auswirkung auf die Funktion des Proteins Ste50 hat. Lediglich die Interaktion mit dem kleinen G-Protein Cdc42 ist nur bei einer der drei Mutanten beeinflusst. Das Genprodukt der Mutante *ste50<sup>P318L</sup>* zeigt im Two-Hybrid-Assay keine Interaktion mit Cdc42. Dieses

Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen von Tatebayashi *et al.*, 2006 überein. Die Interaktion von Ste50 mit Cdc42 verläuft unabhängig von dem Aktivitätszustand von Cdc42. Ste50 bindet sowohl GDP-Cdc42 als auch GTP-CDC42 (Tatebayashi *et al.*, 2006). Dies deutet darauf hin, dass Ste50 an das Rho ähnliche Protein Cdc42 anders bindet als Ste20. Ste20 bindet an Cdc42 über die CRIB Domäne und ist abhängig von GTP. Die Ste50-Cdc42 Interaktion scheint nicht abhängig von GTP zu sein. Dies zeigt sich auch in Interaktionsstudien, die eine Interaktion von Ste50 mit Cdc42 unabhängig von der Aktivierung des invasiven Wachstumswegs zeigen (Hopp, 2005). Im Gegensatz hierzu ist die Interaktion von Ras2 mit Ste50 stärker wenn der Signalweg eingeleitet wird. Dies konnte sowohl in dieser Arbeit mittels Two-Hybrid von Ste50 mit Ras2<sup>val19</sup> als auch biochemisch nachgewiesen werden (Abbildung 3.8; Hopp, 2005). Dies deutet daraufhin, dass die Interaktion von Ste50 mit Cdc42 unabhängig von der Signalinduktion stattfindet, während die Ste50 Ras Interaktion in Abhängigkeit zu der Aktivierung der Signalwege steht. Es kann daher die These aufgestellt werden, dass die Ras Proteine für die Rekrutierung von Ste50 zur Plasmamembran eine Rolle spielen, während die Interaktion von Ste50 zu Cdc42 im Zusammenbringen von Ste11 mit Ste20 eine Rolle spielt. Für den ersten Teil der Hypothese spricht, dass plasmamembranrekrutiertes Ste50- $\Delta$ RA eine RAS2 Deletion im invasiven Wachstumsweg nicht nur komplementieren kann, sondern diesen Weg auch verstärkt einleitet (Abbildung 3.27). Ras2 kann in diesem Falle nicht Cdc42 aktivieren. Es wurde bisher behauptet, dass diese Aktivierung ein Schritt zur Aktivierung des invasiven Wachstumswegs ist (Mösch *et al.*, 1996). Diese Aktivierung könnte eventuell über ein anderes G-Protein wie Ras1 oder Gpa1, welches im invasiven Wachstumsweg eine Rolle spielt, übernommen werden. Ste50 $\Delta$ RA kann auch nicht mit Cdc42 interagieren, da diese Interaktion von der RA Domäne vermittelt wird. Das die Interaktion mit Cdc42 eine sekundäre Rolle spielt, kann damit bewiesen werden, dass zwei Mutanten von STE50 - *ste50*<sup>L322S</sup> und *ste50*<sup>R296G,N301S</sup> – im Two-Hybrid-Assay mit Cdc42 interagieren, und trotzdem nicht den invasiven Wachstumsweg aktivieren (Abbildung 3.8). Es ist daher zu vermuten, dass die Ste50 erst mit Ras und anschließend mit Cdc42 interagiert.

Im Hochosmolaren Antwortweg scheint Ste50 zusätzlich mittels der RA Domäne mit dem Transmembranprotein Opy2 zu interagieren. Opy2 ist an Sho1 Weg im HOG-Signalweg beteiligt spielt aber wie Ste50 keine Rolle in der eigentlichen Phosphorylierungskaskade. Opy2 interagiert mit Ste50 doch scheint auch diese Interaktion nicht durch Induktion des Signalwegs eingeleitet oder verstärkt zu werden (Wu *et al.*, 2006). Eine Membranrekrutierung von Ste50 an die Plasmamembran kann eine OPY2 Deletion in der hochosmolaren Antwort komplementieren. Die untersuchten Ste50-RA Mutanten *ste50*<sup>P318L</sup>, *ste50*<sup>L322S</sup> und *ste50*<sup>R296G,N301S</sup> zeigten keine Interaktion mit Opy2 im Two-Hybrid-Assay. Sie zeigten auch einen Funktionsverlust in der Antwort

auf hochosmolaren Stress. Offensichtlich dient Opy2 im HOG-Signalweg der Rekrutierung von Ste50 an die Plasmamembran.

Die Struktur der RA-Domäne scheint essentiell für deren Funktion zu sein. Da es eine konservierte Sekundärstruktur innerhalb der RA-Domänen und RB-Domänen gibt, so ist es wahrscheinlich, dass die Mutationen die Struktur beeinflussen, und damit die Interaktion zwischen Ste50 und den G-Proteinen nicht möglich ist. Die Mutation *ste50<sup>R296G</sup>* liegt in einem konservierten Bereich, der eine  $\beta$ -Faltblattstruktur aufweist. Diese ist durch die Mutation gestört. *ste50<sup>L322S</sup>* und *ste50<sup>P318L</sup>* liegen in bzw. direkt vor dem letzten  $\beta$ -Faltblatt der RA-Domäne wiederum in einem sehr stark konservierten Bereich. Auch hier wird die vorhergesagte Struktur durch die Mutationen gestört (PHD, Rost, 1996). Es wurde bereits gezeigt, dass dieser Teil von Ste50 wichtig für dessen Funktion ist, da eine Deletion dieses Bereiches von *STE50* ebenfalls zu einem Funktionsverlust führt (Rad *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1996). Wieso diese Mutationen einen so deutlichen Effekt haben, kann erst geklärt werden, wenn die Interaktionspartner der RA Domäne eindeutig charakterisiert wurden, und auch die Kristallstruktur dieser Domäne bekannt ist. Die Vorhersagen zur Struktur durch verschiedene Programme unterscheiden sich zum Teil gravierend, die zum Teil deutlich von der bekannten  $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -Struktur der übrigen bekannten RA-Domänen anderer Proteine abweichen. Von RA-Domänen ist bisher bekannt, dass obwohl insbesondere das erste und zweite  $\beta$ -Faltblatt die Interaktion mit Ras vermitteln, sie durch die Mutationen nicht betroffen sind. Vielleicht ist die Gesamtstruktur durch die Mutationen so gestört, dass keine Interaktion stattfinden kann.

## 4.2 Modulation von MAPK Signalwegen durch das Adaptorprotein Ste50

Ste50 wird als regulatorisches Adaptorprotein bezeichnet. Es ist nicht direkt Bestandteil der eigentlichen Phosphorylierungskaskade. Es dient vielmehr als Modulator der MAPKKK Ste11. Ste50 scheint auf Ste11 in den verschiedenen Signalwegen unterschiedlich zu wirken. Für seine Funktion als Modulator ist die Interaktion von Ste50 mit den kleinen G-Proteinen während der Signaltransduktion essentiell. Neben den kleinen G-Proteinen interagiert Ste50 noch mit weiteren Komponenten des MAPK Signalwegs, so z.B. mit dem Transmembranprotein Sho1 (Tatebayashi *et al.*, 2006). Sho1 ist sowohl in der Osmotoleranz als auch im invasiven Wachstumsweg involviert. Die Interaktion von Ste50 mit Sho1 ist abhängig von der S/T reichen Region, eine Mutante *ste50-D146F* zeigt eine verstärkte Interaktion mit Sho1 (Tatebayashi *et al.*, 2006). Ein weiteres Protein, das mit dem regulatorischen Adaptorprotein Ste50 interagiert, ist das kleine Transmembranprotein Opy2. Es konnte bisher gezeigt werden, dass Opy2 im HOG-Signalweg aktiv ist (Wu *et al.*, 2006). Es scheint, als wäre Opy2 auf

der gleichen Ebene wie Sho1 im Ste50-MAPK-Signalweg einzuordnen, es ist jedoch nicht an der eigentlichen MAPK-Signalkaskade beteiligt (Wu *et al.*, 2006; Tatebayashi *et al.*, 2007).

Alle bisher beschriebenen Interaktionspartner der Ste50-RA Domäne haben trotz ihrer unterschiedlichen Struktur und Funktion doch eine Gemeinsamkeit. So sind sie alle in oder an der Plasmamembran assoziiert. Opy2 und Sho1 besitzen eine, bzw. vier Transmembrandomänen (Reiser *et al.*, 2000; Raitt *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2006). Die kleinen G-Proteine besitzen keine Transmembrandomäne, sind jedoch durch posttranslationale Modifikationen fest an der Plasmamembran verankert. Ein Verlust dieser Modifikationen durch Mutationen in der CAAX-Box führen zu einem Verlust der Funktion der kleinen G-Proteine (Crechet *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2003).

Es bietet sich also die Hypothese an, dass die RA-Domäne von Ste50 für eine Lokalisation von Ste50 und der assoziierten MAPKKK Ste11 zur Plasmamembran beteiligt ist. Dass zumindest die G-Proteine eine Auswirkung auf die Verteilung von Ste50 haben konnte Claudia Hopp bereits zeigen (2005). Sie stellte fest, dass GFP-Ste50 seine Verteilung in der Zelle verändert, wenn die kleinen G-Proteine Cdc42 und Ras2 überexprimiert werden. Die Verteilung verändert sich von gleichmäßig im Cytosol zu einer Anhäufung an die Plasmamembran wo die kleinen G-Proteine anzutreffen sind.

Es sollte nun untersucht werden, wie sich plasmamembranrekrutiertes Ste50 in den Signalwegen zur Induktion der Paarung, des filamentösen Wachstums und der Antwort auf Osmostress verhält. Hierbei ging es nicht nur um die Fragestellung, ob dieses Konstrukt überhaupt funktionstüchtig ist, sondern besonders darum, wie es sich vom wildtypischen Ste50 unterscheidet und ob die RA-Domäne noch weitere Rollen in der Funktion von Ste50 hat.

#### **4.2.1 Plasmamembrantargeting von Ste50- $\Delta$ RA stellt die Funktion als regulatorischer Adaptor im Hochosmolaren Antwortweg wieder her**

Um zu untersuchen, wie sich eine Plasmamembranrekrutierung auf die Funktion von Ste50 auswirkt, wurde ein Ste50 Konstrukt verwendet, bei dem die RA-Domäne (335-346) deletiert war. Stattdessen wurden die 13 C-terminalen Aminosäuren von Ras2 an den N-terminalen Teil von Ste50 Ste50 $\Delta$ RA (AS 1-234) fusioniert. Der C-Terminus von Ras2 enthält die CAAX-Box und führt so zu einer Plasmamembranrekrutierung von nSte50FAR. Die CAAX-Box führt zu einer Farnesylierung und einer anschließenden Palmitoylierung des Proteins. Mittels einer GFP (Green Fluorescent Protein) Fusion an den N-terminalen Teil von nSte50FAR wurde die Lokalisierung des Proteins an die Zelloberfläche nachgewiesen. Als erster Funktionalitätstest wurde *nste50FAR* sowohl

unter Überexpression mit dem *GAL1*-Promotor, als auch nach Integration an den *STE50* Locus im Genom, auf Osmosensitivität untersucht. Es zeigte sich hierbei, dass Stämme, die *nSte50FAR* exprimieren die Osmosensitivität eines  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Stammes vollständig supprimieren können. Die Expression von *nSte50* (AS 1-235) alleine zeigt kein Wachstum unter hochosmolaren Bedingungen. Diese Beobachtung trifft sowohl auf Wachstum auf Festem- wie in Flüssigmedium zu. Es ist hierbei zu beachten, dass der HOG-Signalweg durch die Membranrekrutierung von Ste50 nicht konstitutiv aktiv ist, was für die Zellen letal wäre. Wenn man davon ausgeht, dass die Funktion von Ste50 allein in der Plasmamembranrekrutierung von Ste11 liegt, könnte eine Rekrutierung zur Membran den Signalweg aktivieren: dies trifft jedoch nicht zu. Wird hingegen konstitutiv aktives Ste11 exprimiert und an die Plasmamembran rekrutiert, so kommt es zu einer Aktivierung des HOG-Signalwegs unabhängig von der Präsenz einer erhöhten Osmolytkonzentration (Tatebayashi *et al.*, 2007).

Es bleibt auch die Signalspezifität erhalten. Wäre dies nicht der Fall, so würden die Zellen unter Osmostress in dem G1-Zellzyklus-Arrest enden. Doch dies ist für *nSte50FAR* nicht zu beobachten. Wird jedoch Ste11 an die Plasmamembran in einem  $\Delta ste11 \Delta ste50 \Delta ssk2 \Delta ssk22$  Stamm rekrutiert, so kommt es durch Aktivierung des HOG Signalwegs zur Induktion der Pheromonantwort (Wu *et al.*, 2006). Dies hebt die Funktion von Ste50 für die Signalspezifität hervor.

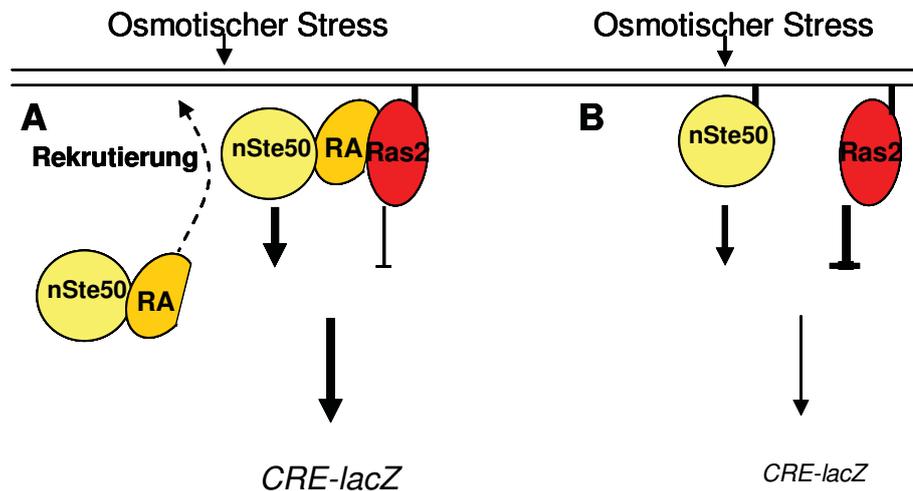
Eine zusätzliche Deletion von *OPY2* hat keinen Einfluss auf die Osmotoleranz von *nste50FAR* Stämmen. Die Expression des Proteins *nSte50FAR* anstelle von wildtypischen Ste50 kann den synthetischen Osmosensitivitätsphänotypen einer  $\Delta opy2 \Delta ssk1$  Mutante vollständig komplementieren (Abbildung 3.15). Hieraus lässt sich schließen, dass Ste50 unterhalb von Opy2 im HOG-Signalweg angesiedelt ist und Opy2 eine Rolle in der Rekrutierung von Ste50 spielt. Eine *OPY2* Deletion zeigt allerdings nicht den gleichen Grad an Osmosensitivität wie eine *STE50* Deletion. So kann ein  $\Delta opy2 \Delta ssk1$  Stamm noch auf 0,4 M NaCl wachsen, während eine  $\Delta ste50 \Delta ssk1$  Mutante unter diesen Bedingungen kein Wachstum mehr zeigt (Abbildung 3.15). Dies deutet darauf hin, dass es nicht Opy2 alleine ist, welches für die Funktion von Ste50 in der hochosmolaren Antwort wichtig ist. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass Ste50 noch eine weitere Funktion hat, welche über die RA Domäne vermittelt wird. Auf diesen Punkt wird im weiteren Verlauf noch genauer eingegangen.

Neben Opy2 ist auch Sho1 im HOG-Signalweg oberhalb von Ste50 eingeordnet. Es wurde untersucht, ob *nste50FAR* auch eine *SHO1* Deletion ähnlich wie eine *OPY2* Deletion komplementieren kann. Es zeigte sich hierbei, dass  $\Delta sho1 \Delta ssk1$  Stämme die zusätzlich *nSte50FAR* exprimieren keine Suppression der Osmosensitivität aufweisen (Abbildung 3.16). Sho1 interagiert mit Ste50, Ste11 und Pbs2. Es ist daher wichtig für das Zusammenbringen der einzelnen Komponenten des HOG-Signalwegs. Dies kann durch *nSte50FAR* nicht ersetzt werden, da es ja nur Ste11 bindet. Zusätzlich dient Sho1

als Verbindung zwischen den Sensoren Msb2 und Hkr1 mit der MAPK Signalkaskade. Diese Funktion kann nicht durch Ste50 ersetzt werden, da es modulierend auf Ste11 wirkt. Sho1 zeigt keine Auswirkung auf die Verteilung von *nste50FAR*. Wie Hkr1 und Msb2 bildet auch Sho1 unter Salzstress fleckenartige Strukturen in seiner Verteilung (Tatebayashi *et al.*, 2007). Diese ähneln im Aussehen solchen, die von *nste50FAR* unter Osmostress gebildet werden. Für die drei Transmembranproteine konnte gezeigt werden, dass sie diese Strukturen unabhängig von einander bilden, was auch für *nste50FAR* zu trifft (Tatebayashi *et al.*, 2007; Abbildung 3.34). Wieso und wie sich diese Flecken bilden ist nicht geklärt, auch ob vielleicht lipid-rafts eine Rolle spielen ist nicht geklärt.

Um die Funktion von nSte50FAR im Vergleich zu wildtypischen Ste50 im HOG-Signalweg näher zu charakterisieren, wurde die Induktion der Expression des *CRE-lacZ* Reportergens untersucht. *nste50FAR* erlaubt die Expression des Reportergens, jedoch liegt das Level der Expression bei nur einem Fünftel des Wildtyps. Dieser Unterschied ist sehr deutlich und zeigt Unterschiede zur Wachstumsanalyse auf, bei der keine Differenz zwischen *nste50FAR* und *STE50* festzustellen war. Es ist zu beachten, dass die Induktion des Reportergens die erste Stunde nach osmotischem Stress untersucht, während die Wachstumsanalysen einen Zeitraum von mehreren Stunden bis Tagen zeigen. Man könnte daher vermuten, dass die feste Plasmamembranrekrutierung von nSte50FAR zu einer veränderten Mobilität und Verteilung der anderen Komponenten wie Ste11, Pbs2 und Hog1 führt. Hog1 wandert nach Induktion des HOG-Signalwegs und Phosphorylierung durch Pbs2 in den Zellkern. Wenn alle Signalkomponenten nun durch die feste Plasmamembranrekrutierung von Ste50 vermehrt an der Zelloberfläche sind, und hierdurch die Mobilität negativ beeinflusst ist, wäre die Dynamik der Signalweiterleitung gestört. Dies kann einen negativen Einfluss auf die Expression des Reportergens haben. Es könnte hingegen auch sein, dass Ste11 durch die starke Bindung an Ste50 nicht für die Signalweiterleitung zur Verfügung steht. Diese Erklärung würde auch die Aktivierung der Pheromonantwort durch plasmamembranrekrutiertes Ste11 in Abwesenheit von Ste50 erklären. Die regulierende Wirkung der SAM-Domäne von Ste50 auf Ste11 wurde durch Ste50-SAM Mutanten gezeigt, die schwächer mit Ste11 interagieren. Diese Mutanten zeigten eine reduzierte Osmotoleranz, und eine verstärkte Aktivierung der Pheromonantwort (Jansen *et al.*, 2001). Es kommt hinzu, dass auch bei Überexpression von einer membranrekrutierten Ste50- $\Delta$ RA eine gegenüber dem Wildtyp deutlich geringere *CRE-lacZ* Expression erfolgt (Tatebayashi *et al.*, 2006). Die geringere Aktivität von nSte50FAR gegenüber wildtypischen Ste50 im HOG-Signalweg, wird auch im Crosstalkassay deutlich. Crosstalk zum Pheromonantwortweg bzw. FG-Weg entsteht, wenn das Signal des osmotischen Stresses aufgrund einer Unterbrechung im Signalweg nicht weitergeleitet werden kann. Dies tritt bei  $\Delta$ *hog1* oder  $\Delta$ *pbs2* Mutanten auf (Hall *et al.*, 1996; O'Rourke and Herskowitz, 1998).

Der Crosstalk ist abhängig vom Sho1 und Msb2 und benötigt Ste50 (Tatebayashi *et al.*, 2007). Hier konnte gezeigt werden, dass auch Opy2 für Crosstalk benötigt wird, aber dies durch die Expression von nSte50FAR supprimiert wird (Abbildung 3.18). Der Crosstalk bei *nste50FAR* ist um den Faktor drei reduziert. Hierbei zeigt eine zusätzliche Deletion von *OPY2* keinen Unterschied in der Aktivierung des Reportergens.



**Abbildung 4.1 Schematische Modell der unterschiedlichen Regulation der *CRE-lacZ* Aktivität durch Ste50 und nSte50FAR**

**A** Durch die Aktivierung des Signalwegs wird Ste50 an den Signalkomplex rekrutiert. Dies führt zu einer Aktivierung des Signalwegs. Ste50 moduliert über die RA Domäne Ras und schwächt so die hemmende Aktivierung des PKA Signalwegs ab. **B** *nste50FAR* ist an die Plasmamembran gebunden und kann nicht über die RA Domäne mit Ras interagieren. So wird über den PKA Signalweg die *CRE* Aktivierung unterdrückt.

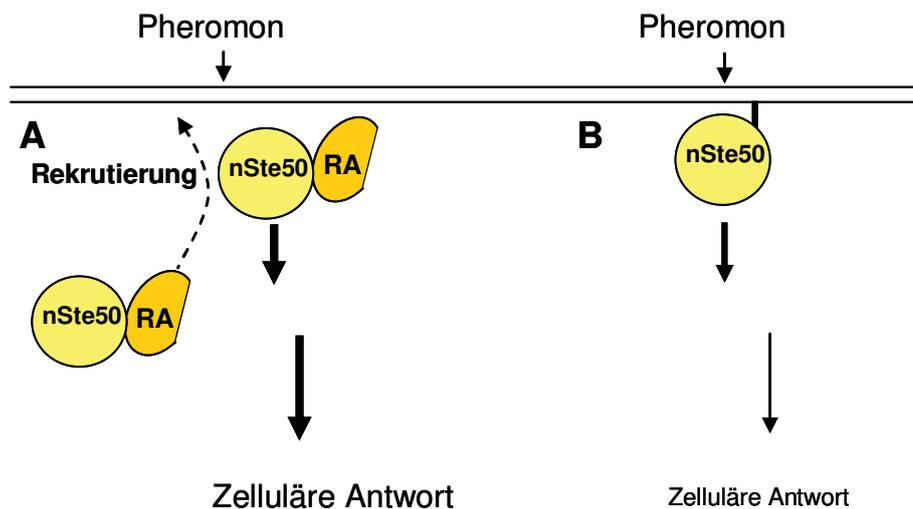
Die geringere Aktivierung des *CRE-lacZ* Reporters kann jedoch auch am Fehlen der RA-Domäne liegen. Die RA-Domäne vermittelt die Interaktion mit Ras2. Wenn nun Ste50- $\Delta$ RA exprimiert wird, kann es nicht mehr mit Ras2 interagieren. Ras2 kann dann vermehrt mit der Adenylatzyklase interagieren, was in einem erhöhten Level von cAMP resultiert. Ein erhöhtes Level von cAMP bzw. eine erhöhte Aktivität von Ras2 suppremiert die zelluläre Stressantwort (Stanhill *et al.*, 1999). Dass die RA-Domäne von Ste50 sich negativ auf die Aktivität von Ras auswirkt wurde bereits gezeigt. So unterdrückt eine Überexpression der RA-Domäne die Induktion des filamentösen Wachstumsweg durch die hyperaktive Ras<sup>val19</sup> Mutante (Truckses *et al.*, 2006). Ras2<sup>val19</sup> interagiert verstärkt mit Ste50, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abbildung 3.8). Ein Zusammenhang von Ste50 und dem Ras/cAMP Weg in der Stressantwort und Langlebigkeit der Zelle wurde bereits gezeigt (Poplinski *et al.*, 2007). So führt eine  $\Delta$ ste50  $\Delta$ pde2 Mutante zu einer erhöhten Osmosensitivität, während es bei eine  $\Delta$ ste11  $\Delta$ pde2 diesen Effekt nicht gibt. Es wurde zudem gezeigt, dass der Ras/cAMP Signalweg

sich direkt hemmend auf den *CRE*-Sequenz bindenden Transkriptionsfaktor Sko1 auswirkt (Pascual-Ahuir *et al.*, 2001). Dieser negative Einfluss könnte die verminderte Aktivierung von *CRE-lacZ* durch nSte50FAR erklären. Die Plasmamembranrekrutierung von nSte50FAR würde zwar Ste11 für den HOG-Signalweg rekrutieren. Die fehlende Interaktion mit Ras2 führt zu einer verstärkten Aktivierung des Ras/cAMP Signalwegs, was sich hemmend auf die Expression des Reporters auswirkt (Abbildung 4.1).

#### **4.2.2 In der Antwort auf Paarungspheromon schwächt eine Plasmamembranrekrutierung von Ste50- $\Delta$ RA die Wirkung als positiver Modulator ab**

Ste50 spielt in der Antwort auf Paarungspheromon eine wichtige Rolle. Deletion von *STE50* führt zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Paarungspheromon. Sowohl die SAM-Domäne als auch die RA-Domäne von Ste50 sind für die korrekte Funktion des Proteins notwendig. Ste50 funktioniert als Modulator der Ste11 Aktivität in diesem Weg. Die Notwendigkeit für die RA Domäne von Ste50 kann durch die Plasmamembranrekrutierung von Ste50- $\Delta$ RA teilweise supprimiert werden. Es zeigen sich Unterschiede zum wildtypischen Ste50. In einem Halo-Assay zeigen Wildtyp und *nste50FAR* Stämme Halos von der gleichen Größe und die gleiche Rate an Adaption an die Präsenz des Pheromons. Untersucht man jedoch die Expression des Reportergens *FUS1-lacZ* so werden doch Unterschiede aufgedeckt. Bei integriertem *nste50FAR* zeigt sich eine geringere Expression des Reportergens (Abbildung 3.20). Dieser Effekt ist bei Überexpression von nSte50FAR nicht zu beobachten, denn dann zeigt sich das gleiche Level wie Wildtyp Ste50. Dies bedeutet, dass nSte50FAR wie Ste50 dosisabhängig auf die Pheromonantwort wirkt. Eine Überexpression von Ste50 führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Paarungspheromon (Xu *et al.*, 1996). Eine Überexpression von nSte50FAR führt ebenfalls zu solch einer erhöhten Sensitivität gegenüber Paarungspheromon. Dies deutet darauf, dass diese im engen Zusammenhang mit der Ste50-Ste11 Interaktion ist. Die Signalweiterleitung im Pheromon-Antwortweg findet an Stellen des polarisierten Wachstums statt. Es bilden sich große Signalkomplexe, die neben der MAPK-Signalweiterleitung über  $G_{\beta\gamma}$ , Cdc42-Ste20, Ste11, Ste5 und weiteren Komponenten auch weitere Funktionen haben. So kommt es zu einer Neuordnung des Aktinzytoskeletts an diesen Stellen. Ste50 spielt eine Rolle in der Rekrutierung von Ste11 zu diesem Signalkomplex. So führt die eine künstliche Interaktion von Ste50 mit Ste5 zu einer verstärkten positiven Aktivierung des Pheromonsignalwegs (Bashor *et al.*, 2008). Dieser Effekt beruht auf der verstärkten Rekrutierung von Ste11 durch Ste50 zu dem Signalkomplex. Bei Wildtyp Ste50 übernimmt diese Rolle die RA Domäne, denn eine Deletion der RA Domäne führt zu einer verminderten Pheromonsensitivität. Wird Ste50-

$\Delta$ RA hingegen an die Plasmamembran rekrutiert, kommt der Ste50-Ste11 Komplex zwar in eine räumliche Nähe zu Ste5 und den anderen Komponenten des Signalwegs. Die subzelluläre Konzentration bleibt jedoch geringer als bei Wildtyp Ste50 (Abbildung 3.22). Wird nSte50FAR hingegen überexprimiert, erhöht dies die subzelluläre Konzentration an nSte50FAR und eine optimale Signalweiterleitung wird gewährleistet. Wobei eine Überexpression von Ste50 die Pheromonsensitivität erhöht. Die Antwort auf die Präsenz von Paarungspheromon ist abgestuft. So reicht schon ein schwaches Signal aus um einen G1-Arrest auszulösen, jedoch nicht eine Aktivierung des *FUS1-lacZ* Reportergens oder der Bildung von Paarungsfortsätzen. Ein schwaches Signal aktiviert hauptsächlich die MAPK Kss1. Ein starkes Signal hingegen führt über die Aktivierung der MAPK Fus3 zu einem G1-Arrest und aktiviert auch die Expression von *FUS1-lacZ* und die Bildung von Shmoo. Das nSte50FAR schwache Signale weiterleiten kann, zeigt sich darin, dass der G1-Arrest fast gleich dem Wildtyp ist. So zeigen sich sowohl im Haloassay (Abbildung 3.19) und im Buddingindex (Abbildung 3.22 A) nur geringe Unterschiede. Tests, die die Zellantwort auf starke Signale untersuchen, zeigen deutlichere Unterschiede zwischen nste50FAR und dem Wildtyp. Sowohl im *FUS1-lacZ* Test (Abbildung 3.21) als auch im Schmooinde (Abbildung 3.22 B) zeigt sich eine deutliche Reduzierung gegenüber dem Wildtyp. In einem Wildtypstamm wird das anfängliche Signal, ausgelöst durch das Paarungspheromon, innerhalb der MAPK Signalkaskade amplifiziert. Ein Faktor für diese Amplifizierung ist die Bildung eines stabilen Adaptor-Scaffold (Ste5)-MAPK-Komplexes. Membranassoziertes nSte50FAR steht möglicherweise diesem Komplex nicht mehr zur



**Abbildung 4.2 Schematische Modell der unterschiedlichen Regulation der Pheromon-Antwort durch Ste50 und nSte50FAR**

**A** Durch die Aktivierung des Signalwegs wird Ste50 an den Signalkomplex rekrutiert. Da Ste11 fest an Ste50 gebunden ist, führt sie zu einer verstärkten Aktivierung des Signalwegs. Ste50 moduliert den Signalweg positiv. **B** *nste50FAR* ist an die Plasmamembran gebunden und kann nicht über die RA Domäne an die Signalmoleküle gebunden werden. Die zelluläre Antwort wird abgeschwächt.

Verfügung, wodurch das eingehende Signal nicht mehr richtig verstärkt werden kann, resultierend in einem schwächeren Signal. Dies ist genau der gegenteilige Effekt dessen, was Bashor *et al.* durch eine feste Bindung von Ste50 an das Scaffoldprotein Ste5 erreicht haben.

Eine Deletion von *OPY2* führt zu einer leichten Senkung der *FUS1-lacZ* Expression. Dies ist auch für eine Deletion von *OPY2* im *nste50FAR* Hintergrund zu beobachten, was daraufhin deutet, dass möglicherweise Opy2 in diesem Weg eine Ste50 unabhängige Funktion hat. Es wurde beschrieben, dass die Überexpression von Opy2 Resistenz gegenüber Paarungspheromon vermittelt (Edwards *et al.*, 1997). Es könnte daher sein, dass Opy2 Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von Ste50 und Ste11 nimmt. Die Komponenten der Signalwege bilden Komplexe zur Signalweiterleitung. Die Bildung dieser Komplexe ist möglicherweise durch das fehlen von Opy2 gestört.

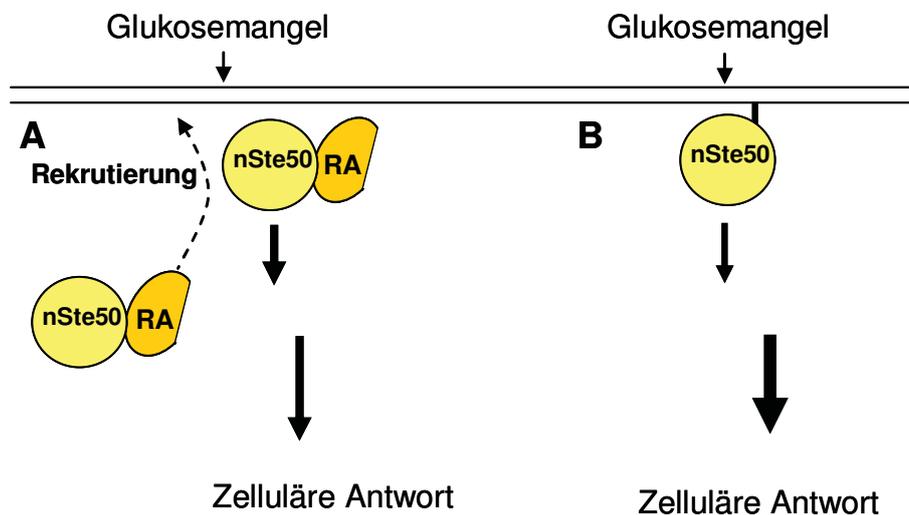
Die Antwort auf Paarungspheromon wird nicht nur durch die Stärke der Antwort beschrieben, sondern auch durch die Dauer der Antwort, also den Zeitraum bis sich die Zellen an die Präsenz des Pheromons angepaßt haben. Die Zeit, die Zellen benötigen, um sich an die Präsenz von Paarungspheromon zu adaptieren wird durch die plasmamembranassoziation von nSte50FAR nicht beeinflusst. Besonders am Budding-Index ist zu sehen, dass Zellen mit *nste50FAR* zwar zu einem geringeren Teil in der G1-Phase arretieren, jedoch ist sowohl bei Wildtyp als auch bei *nste50FAR* nach 150 Minuten der Anteil an nicht knospenden Zellen wieder auf Ausgangsniveau gefallen (Abbildung 3.22 A). Das bedeutet, dass trotz schwächerer Induktion der Signalantwort die Adaption nicht beeinflusst wird. Der Adaptionsmechanismus der Zelle an Pheromon ist somit unabhängig von der Ste50-RA Domäne. Es zeigt sich also, dass *nste50FAR* hauptsächlich auf die Stärke der Signalantwort und nicht auf die Dauer wirkt.

#### **4.2.3 Plasmamembranrekrutierung von Ste50 führt zu einer verstärkten Induktion des invasiven Wachstums**

Es ist bekannt, dass sowohl der Ras/cAMP-Signalweg und der MAPK vermittelte Signalweg für die Induktion des invasiven Wachstums benötigt werden. Es gab auch deutliche Zeichen dafür, dass beide Signalwege in Wechselwirkung zueinander stehen (Mösch *et al.*, 1999; Hopp, 2005). Welche Bedeutung beide Wege bei der Induktion des invasiven Wachstumswegs haben ist noch nicht deutlich geklärt. Insbesondere bleibt unklar wie die Sensoren den MAPK-Signalweg aktivieren. Die Bedeutung von Ras2 für das invasive Wachstum ist unbestritten (Mösch *et al.*, 1996). Doch wie Ras2 das MAPK-Signal induziert und wie es Cdc42 aktiviert ist noch nicht beschrieben worden. Ein zentrales Protein des invasiven Wachstumswegs ist Flo11. Flo11 vermittelt die Zell-Zell und Zell-Substrat Adhäsion. Die Transkription von *FLO11* ist durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren gesteuert. Eine zentrale Rolle nimmt hier Flo8 ein. Flo8 wird über

den Ras/cAMP-Signalweg gesteuert. Stämme, denen *FLO8* fehlt – so der W303 Stammhintergrund - zeigen kein invasives Wachstum. Die Transkriptionsfaktoren Tec1 und Ste12 werden durch die MAPK Signalwege reguliert. Tec1 wird durch Fus3 phosphoryliert und anschließend degradiert. Es stellte sich die Frage, ob der Einfluss der MAPK Signalwege auf das invasive Wachstum durch die Fus3 vermittelte Degradierung von Tec1 abgeschwächt wird. Es stellte sich heraus, dass  $\Delta fus3$  Stämme Adhäsion zeigen können (Abbildung 3.32).

Ste50 ist Teil des MAPK-Signalwegs, der sowohl invasives Wachstum in Hapliden als auch Pseudohyphenbildung in Diploiden induziert. Wie würde sich eine Plasmamembranrekretierung von Ste50- $\Delta$ RAD auf die Signalweiterleitung in diesem Zusammenhang auswirken? In diploiden Zellen zeigte die Expression eine verstärkte Bildung von Pseudohyphen, auch sind die Zellen stark elongiert. Diesen Phänotyp wird



**Abbildung 4.3 Schematische Modell der unterschiedlichen Regulation des invasiven Wachstumswegs durch Ste50 und nSte50FAR**

A Ste50 wird an die Plasmamembran rekrutiert und interagiert dort mit Ras2. Hierdurch wird der Signalkomplex zusammengefügt. B Die feste Plasmamembranrekretierung von nSte50FAR simuliert die Ste50 - Ras2 Interaktion. Hierdurch wird der Signalweg verstärkt eingeleitet.

sonst bei einer Expression von hyperaktivem Ras2<sup>val19</sup> gezeigt (Gimeno *et al.*, 1992).

In haploiden Zellen zeigt die Expression von Ras2<sup>val19</sup> gleichfalls Auswirkungen auf den invasiven Wachstumsweg. Um zu klären ob dies über den MAPK-Signalweg läuft und ob hierfür Ste50 benötigt wird, wurden sowohl ein Adhäsionsassay, als auch Reporterassay mit *FLO11-lacZ* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine *STE50* Deletion sowohl das adhäsive Wachstum bei einer Ras2<sup>val19</sup> Expression als auch die Aktivierung der Expression von *FLO11-lacZ* unterbindet (Abbildung 3.28 und 3.29). Das bedeutet, dass die Wirkung von Ras2 auf den invasiven Wachstumsweg in *Saccharomyces cerevisiae* hauptsächlich über Ste50 und den MAPK Signalweg stattfindet. Das Ras2 im invasiven

Wachstumsweg mehr über den MAPK-Signalweg wirkt und nur schwach über den PKA Signalweg wurde auch durch in silico modelling vorhergesagt (Sengupta *et al.*, 2007; Vinod & Vankatesh 2007). Mösch *et al.*, 1999 konnten zeigen, das Ste20 zwar eine Rolle einnimmt, aber nicht essentiell ist, wie in anderen Wegen. Das Ras2<sup>val19</sup> Auswirkungen auf das vegetative Wachstum hat, welche von Ste50 unabhängig ist, zeigt sich an dem schwächeren Wachstum der Stämme auf den Platten. Ras2 ist ein Interaktionspartner der RA Domäne von Ste50. Es konnte gezeigt werden, das die Interaktion von Ras2 mit Ste50 in induzierendem SLAG Medium stärker ist als unter nicht induzierenden Bedingungen (Hopp, 2005).

In dieser Arbeit konnte mittels Two-Hybrid-Analyse gezeigt werden, dass Ste50 stärker mit Ras2<sup>val19</sup> interagiert als mit Ras2. Wenn es für die Funktion von Ste50 im MAPK-Signalweg des invasiven Wachstums wichtig ist an die Plasmamembran rekrutiert zu werden, könnte hierbei Ras2 eine entscheidende Rolle einnehmen. Es stellt sich so die Frage, ob Ste50 von Ras2 an der Membran rekrutiert wird? Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde *nSte50FAR* in  $\Delta ras2$  Stämmen transformiert. Die Expression von *nSte50FAR* erlaubt Adhäsion nicht nur in  $\Delta ste50$  Zellen, sondern auch im  $\Delta ste50 \Delta ras2$  Stammhintergrund (Abbildung 3.26). Der positive Einfluss der Membranrekrutierung von *nSte50FAR* auf den invasiven Wachstumsweg wird so deutlich. Die Induktion des Wegs ist sogar gegenüber einem Wildtypstamm verstärkt, was sich an der Expression von *FLO11-lacZ* als Reporter gen klar zeigt (Abbildung 3.27). Es zeigt sich auch ein erhöhtes basales Level in logarithmisch wachsenden Zellen. Dies deutet darauf hin, dass der Weg auch ohne Glukosemangel schwach eingeleitet wird. Neben dem erhöhten *FLO11* Expressionslevel wird auch der *FG(TyA)-lacZ* Reporter verstärkt exprimiert, wenn *nSte50FAR* anstatt Ste50 in der Zelle ist (Abbildung 3.24). *FG(TyA)-lacZ* ist abhängig von Tec1 und Ste12 und somit unter der Kontrolle durch den Ste50-MAPK Signalweg. Es gibt daher die Auswirkung von *nste50FAR* auf die Signalweiterleitung in MAPK-Signalweg wieder. Anhand der zusammengenommenen Ergebnisse lässt sich sagen, dass die Membranrekrutierung von Ste50- $\Delta$ RA den invasiven Wachstumsweg verstärkt einleitet. Ein weiterer Punkt ist, dass in diesem Signalweg im Gegensatz zu den anderen keine negativen Feedback Mechanismen bekannt sind. Diese sind auch nicht nötig, da der invasive Wachstumsweg eine langfristige Adaption darstellt, während die beiden anderen Wege eine schnelle Reaktion und Adaption der Zelle benötigen. Es wird daher vielleicht auch kein eigenes Scaffoldprotein benötigt, so dass Ste50 eine solche Rolle einnimmt. Daher führt die Membranrekrutierung von Ste50 zu einer verstärkten Induktion des invasiven Wachstumswegs. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die Abwesenheit der Ste50-RA Domäne die Bindung potentieller Inhibitoren des filamentösen Wachstumswegs über die RA-Domäne blockiert ist.

Opy2 hat auch in invasiven Wachstumsweg einen Einfluss auf die Aktivität des MAPK-Signalwegs. Eine Deletion von *OPY2* in haploiden Zellen senkt die Expression *FG(TyA)-lacZ* um 24%, führt aber nicht zu einem Verlust der Adhäsion. Diese Senkung der Aktivität ist gegenüber einer *STE50* Deletion mit einer Senkung um 60% gegenüber Wildtyp schwächer, was darauf deutet, dass Opy2 für den invasiven Wachstumsweg nicht essentiell ist.

Es gibt jedoch auch im filamentösen Wachstumsweg einen Crosstalk vom Ras/cAMP Signalweg in den MAPK Signalweg (Mösch *et al.*, 1999). Dieser Crosstalk findet unterhalb von Ste20 statt. Eine Erhöhung des cAMP Spiegels in der Zelle wirkt sich in Abhängigkeit von Ste50 positiv auf die Expression von *FG(TyA)-lacZ* aus (Hopp, 2005). Der Mechanismus des Zustandekommens des Crosstalks ist bisher unklar. Eine Überexpression der PKA Untereinheiten Tpk1-3 kann eine *STE20* Deletion komplementieren - jedoch keine *STE12* oder *TEC1* Deletion. Das bedeutet, dass die Wirkung der Tpk Proteine unterhalb von Ste20 wirken muss. Ste50 ist unterhalb von Ste20 im invasiven Wachstumsweg eingeordnet. Überexpression von Tpk1 führt zu einer erhöhten Expression von *FLO11-lacZ* und zu adhäsivem Wachstum unabhängig von der Anwesenheit von Ste50 (Abbildung 3.29). Es lässt sich daraus schließen, dass die Wirkung der Tpk auf den Ste50-MAPK-Signalweg unterhalb von Ste50 stattfindet, möglicherweise direkt auf die Transkriptionsfaktoren Ste12 oder Tec1. So könnte der PKA Signalweg auf dem MAPK Signalweg Einfluss nehmen, ähnlich wie in der Stressantwort beide Wege den Transkriptionsfaktor Sko1 phosphorylieren.

### **4.3 Verteilungsmuster von nSte50FAR an der Plasmamembran während der Signaltransduktion**

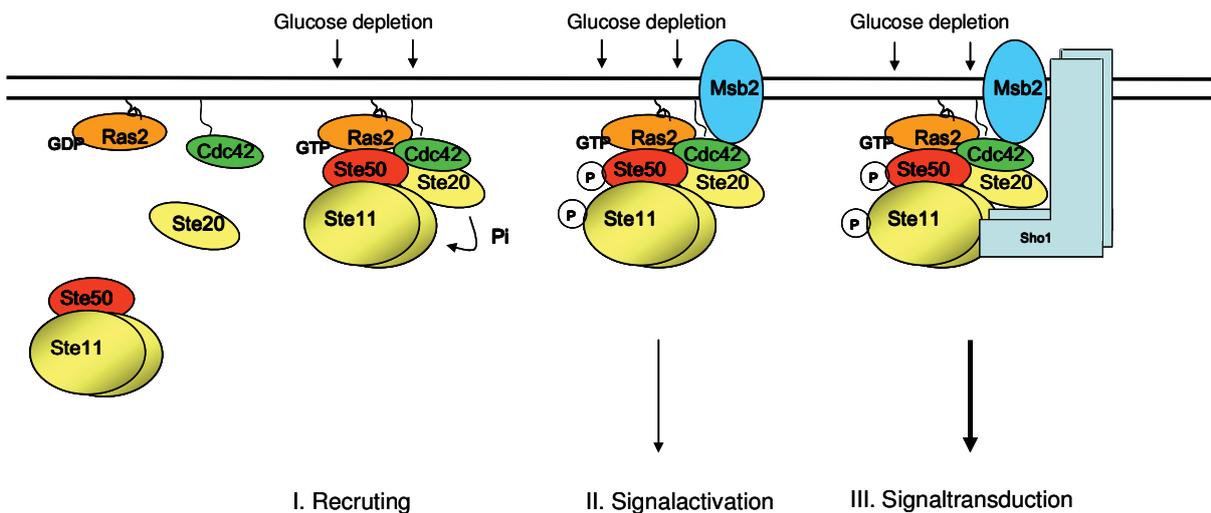
In dieser Arbeit wurde nicht nur die Funktion von plasmamembranrekrutiertem Ste50- $\Delta$ RAD untersucht, sondern auch das Verteilungsmuster eines GFP-nSte50FAR Fusionproteins nach Einleitung des MAPK-Signalwege. Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen während der Signaltransduktion ist eng an ihre Funktion gekoppelt. Dies wird ganz besonders im polarisiertem Wachstum deutlich. Hier zeigt es sich, dass viele Komponenten die zum Beispiel an der Shmoos Bildung beteiligt sind, so Fus1 und Ste20, an die Shmoospitze lokalisiert werden. Aber auch Komponenten wie Ste5 und Fus3 werden an die Shmoospitze rekrutiert (Drogen *et al.*, 2000; Maeder *et al.*, 2007). Dies deutet daraufhin, dass sich die an der Signalübertragung beteiligten Proteine räumlich annähern, um so eine ideale Signalweiterleitung zu ermöglichen. Für Ste50 konnte gezeigt werden, dass es nach Einleitung des Hochosmolaren Antwortwegs punktförmige Strukturen bildet (Posas *et al.*, 1998; Hopp, 2005). Allerdings haben die Autoren unter diesen Bedingungen keine Membranfärbung bzw. Anhäufung von Ste50 an der Plasmamembran festgestellt.

Unter normalen Wachstumsbedingungen lokalisiert nSte50FAR zur Zelloberfläche an der Plasmamembran und zeigt eine gleichmäßige Färbung. Nach Induktion des Hochosmolaren Antwortwegs, sind fleckenartige Strukturen an der Zelloberfläche zu sehen. Ähnliche Strukturen sind auch für Sho1, Msb2 und Hkr1 beschrieben worden, auch diese bilden sich nach Induktion des Hochosmolaren Antwortwegs (Tatebayashi *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, bei einer Deletion von *STE20* die fleckenartigen Strukturen nach Zugabe von Salz nicht so kompakt an der Zelloberfläche vorkommen, und teilweise fast ringförmige Strukturen aufweisen. Hingegen zeigt sich bei einer *SHO1* Deletion, dass sich weniger solcher fleckenartigen Strukturen bilden, und eher als gleichmäßige Färbung an der Zelloberfläche erscheinen. Dies bedeutet, dass andere Proteine Einfluss auf die Veränderung in der Verteilung von GFP-nSte50FAR nehmen. Diese Veränderungen in der Verteilung an der Plasmamembran sind möglicherweise auf die Einlagerung in Lipid-Rafts zurück zu führen. Es ist bekannt, dass Zellen Lipid-Rafts zur gezielten Lokalisierung von Proteinen nutzen (Bagnat & Simons, 2002). Daher bieten sich Lipid-Rafts als Erklärung für die punktförmigen Strukturen an. Auffällig ist auch, dass gerade Ste20 eine deutliche Veränderung in den fleckenartigen Strukturen zeigt. Ste20 ist zusammen mit Cdc42 an der Kontrolle der Zellpolarität und an der Polarisierung des Aktinzytoskeletts beteiligt (Leonhard & Nurse, 2002; Holly & Blumer 1999). Es könnte daher sein, dass für die Bildung der fleckenartigen Strukturen Aktin benötigt wird. Es ist jedoch nicht deutlich, ob sich die fleckenartigen Strukturen noch an der Plasmamembran befinden. Vergleicht man die Färbung von GFP-*nste50FAR* nach Zugabe von Salz mit der Färbung des corticalen Endoplasmatischen Retikulums (ER), so zeigen sich deutliche Gemeinsamkeiten. Beide Färbungen befinden sich in der äußersten Peripherie der Zelle und weisen fleckenartige Strukturen auf, die durch Abschnitte gleichmäßiger Färbung verbunden sind. Dies wurde für das Corticale ER mehrfach gezeigt (de Craene *et al.*, 2006; Loewen *et al.*, 2007). Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass eine solche Ähnlichkeit zufälliger Natur ist.

In der Pheromonantwort lokalisiert Ste50 sich diffus zur Shmoospitze (Hopp, 2005). Für GFP-nSte50FAR konnte keine Veränderung der Verteilung an der Zellmembran beobachtet werden. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die RA Domäne in diesem Protein fehlt. Denn für Ste50 konnte gezeigt werden, dass die kleinen G-Proteine Ras2 und Cdc42 die subzelluläre Verteilung von Ste50 beeinflussen (Hopp, 2005). Cdc42 ist an Prozessen des polarisierten Wachstums wie Knospen und Paarungsprojektion detektierbar, und könnte daher eine Rolle in der Rekrutierung von Ste50 an die Shmoospitze eine Rolle spielen. Da dies für GFP-nSte50FAR nicht möglich ist, sind auch keine Veränderungen in der Lokalisation detektierbar.

#### 4.4 Ste50 als regulatorischer Adaptor im invasiven Wachstumsweg – Ein Modell

Das Protein Ste50 dient als Regulator der MPKKK Ste11 in der MAPK-Signalweiterleitung. Es ist wichtig für den invasiven Wachstumsweg, denn Zellen denen Ste50 fehlt, können nicht mehr invasiv wachsen. Anhand der Ergebnisse lässt sich ein Modell der Funktion von Ste50 im invasiven Wachstumsweg erstellen und so die Funktion von Ste50 zusammenfassen. In einer wachsenden Zelle liegt Ste50 in einem Heterotrimer mit zwei Ste11 Molekülen vor. Ras2 liegt in der Zelle in seiner inaktiven GDP-gebundenen Form vor. Wenn nun ein Mangel von Glukose eintritt, wird Ras2 aktiviert und bindet GTP anstatt GDP. Diese Form von Ras2 kann die RA-Domäne von Ste50 verstärkt binden und rekrutiert so den Ste50- Ste11 Komplex an die Zellmembran. Parallel dazu wird Ste20 durch Cdc42 an der Plasmamembran aktiviert. Aktiviertes Ste20 phosphoryliert Ste11, welches wiederum Ste50 phosphoryliert. Hierdurch könnte die Interaktion zwischen



#### Abbildung 4.4 Modell für die durch Ste50 vermittelte Aktivierung von Ste11 unter Glukosemangel

Durch Glukosemangel liegt Ras2 in seiner aktivierten Form vor. Es bindet GTP anstatt GDP. Durch diese Aktivierung kann Ste50 verstärkt gebunden werden. So wird der Ste50-Ste11 Komplex an die Plasmamembran rekrutiert (**I. Rekrutierung**). Dies bringt den Komplex in räumliche Nähe von aktiviertem Cdc42-Ste20. Die PAK Ste20 kann nun Ste11 phosphorylieren und somit aktivieren. Aktiviertes Ste11 phosphoryliert Ste50. Durch die Phosphorylierung wird die Bindung zwischen Ste50 und Ras2 bzw. Cdc42 verstärkt. Es bildet sich ein Signalkomplex (**II. Signalaktivierung**). Durch die Proteine Msb2 und Sho1 wird der Signalkomplex vervollständigt und die Signaltransduktion findet statt (**III. Signaltransduktion**).

Ste50 und Ras2 bzw. Cdc42 verstärkt werden und so den Komplex stabilisieren. Auf diese Weise wird die Signaltransduktion verstärkt. Ste50 würde so mittels seiner SAM Domäne am N-Terminus und seiner carboxyterminalen RA Domäne als Bindeglied zwischen der PAK Ste20 im Komplex mit Cdc42 und Ste11 fungieren. Die Bindung von die Ras2-Ste50- Ste11 Bindung dient auch der Signalspezifität. Bände aktiviertes Ste11

an Ste5, so würde der Pheromon-Antwortweg eingeleitet werden. Es ist also so, dass Ste50 an dieser Stelle die Adaptorfunktion als eine Art Gerüstprotein übernimmt. Sho1 mit Msb2 vervollständigen den Signalkomplex (Abbildung 4.4).

Es lässt sich also zusammenfassen, dass Ste50 ein regulierendes Adaptorprotein darstellt. Es verbindet die G-Proteine mit dem MAPK-Signalkomplex. Die subzelluläre Verteilung des Ste50-Signalkomplexes scheint eine wichtige Rolle bei der optimalen und effizienten Signaltransduktion zu spielen. Ste50 allein führt aber nicht zur Aktivierung der Signalwege, was bedeutet, dass andere Komponenten wie Ste20 eine aktivierende Rolle bei der subzellulären Verteilung spielen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ein zentrales Thema der Biologie ist die Fragestellung, wie Zellen externe Signale zu einer adäquaten Antwort verarbeiten. Eukaryotische Zellen benutzen für die Signalweiterleitung konservierte Signalwege, einer dieser ist der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Weg. Die MAPK-Wege sind eng mit rezeptorassoziierten G-Proteinen verbunden. In dieser Arbeit wurde das Protein Ste50 untersucht, das ein essentielles Komponente der drei MAPK-Signalwege der Hefe ist: den Pheromon-Antwortweg, den filamentöses Wachstumsweg und den HOG-Signalweg (high osmolarity glycerol). Ste50 ist ein regulatorisches Adaptorprotein. Es bindet einerseits an rezeptorassoziierte G-Protein Effektoren, um sich mit dem Ligand-Rezeptorkomplexen an der Plasmamembran zu verknüpfen, und andererseits bindet es an die MAPKKK Ste11 um die Aktivierung des MAPK-Signalkomplexes zu modulieren. Ste50 besteht aus drei distinkten Bereichen - die sterile-alpha-motif (SAM)-Domäne, einen Serin/Threonin reichen Teil und eine Ras-associated (RA)-Domäne. In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von Mutationen innerhalb der RA-Domäne von Ste50 untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass durch Austausch bestimmter Aminosäuren ein kompletter Funktionsverlust in allen drei untersuchten Wegen stattfindet. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob sich die Mutationen auf die Interaktion zwischen Ste50 und den G-Proteinen Ras1, Ras2, Cdc42 und dem Transmembranprotein Opy2 auswirken. Es stellte sich heraus, dass nur eine Mutante nicht mit Cdc42 interagiert und keine der drei Mutanten eine Interaktion mit Ras1, Ras2 oder Opy2 zeigt. Es konnte auch gezeigt werden, dass Ste50 stärker mit Ras2<sup>val19</sup>, dominant aktivierte Form von Ras2 interagiert als mit Ras2.

Die Untersuchungen der Auswirkung einer Rekrutierung von Ste50 an der inneren Zellmembran (*nste50FAR*) auf dessen Funktion als Modulator der drei Signalwege ergaben differenzierte Antworten. Die Osmostressantwort (HOG-Signalweg) war von der *nste50FAR* nicht beeinflusst, während es zu einer Abschwächung der Signaltransduktion in der Pheromonantwort führte. Für filamentöses Wachstum zeigte es sich ein gegensätzlicher Effekt. So wurde filamentöses Wachstumsweg durch *nste50FAR* verstärkt und mehr anhaltend aktiviert und es komplementierte zudem der filamentöses Wachstumsdefekt der *RAS2* Deletionsmutante. Untersuchungen zur Lokalisierung von *nste50FAR* ergaben, dass sich die Verteilungsmuster von GFP-*nSte50FAR* an der Zellmembran durch Induktion des HOG-Signalwegs verändern und dass diese Veränderung in Zusammenhang mit der PAK-ähnliche Kinase Ste20 steht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Funktion von Ste50 und somit der RA-Domäne über eine einfache Rekrutierung der Signal-Komponenten zu einem Komplex hinausgeht und die Dauer und Stärke der Signalweiterleitung mitbestimmen.

## Summary

How cells interpret external signals and react adequately to the stimulus is one of the central questions of Biology. Eukaryotic cells use conserved signalling pathways for signal transmission. One of these pathways is the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway. The MAPK pathways are closely connected to receptor associated G-Proteins. In this study, we have investigated the protein Ste50, which is an essential component of three MAPK signalling pathways in yeast: the pheromone response pathway, the filamentous growth pathway and the High Osmolarity glycerol (HOG) pathway. Ste50 is a regulatory adaptor protein. On the one hand it binds to membrane associated G-protein effectors to connect with ligand-receptor complexes at the plasma membrane and on the other hand it binds to the MAPKKK Ste11 in order to modulate the activation of the MAPK signalling complexes. Ste50 consists of three distinct regions – the sterile alpha motif (SAM) domain, a serine/threonine rich region and a Ras associated (RA) domain. In this study, the effect of mutations within the RA-domain of Ste50 was addressed. It has been found that single amino acids exchanges in RA domain resulted in a complete loss of function within all three tested signalling pathways. In this context we analyzed whether these mutations influence the Interaction between Ste50 and the small G-proteins Ras1, Ras2, Cdc42 and the transmembrane protein Opy2. None of them showed an interaction with Ras1, Ras2 or Opy2, but only one of the three mutants could not interact with Cdc42. It could further be shown that interaction between Ste50 and Ras2<sup>val19</sup>, a dominant activated form of Ras2, was stronger than between that and Ras2.

Investigation of the effects of artificial recruitment of Ste50 to plasma membrane (nste50FAR) yielded differentiated responses through the three MAPK-mediated pathways. The osmostolerance was not altered by nste50FAR, while it resulted in a reduced signal transduction by the pheromone response pathway. In contrast, nste50FAR resulted in strengthened and more sustained activation of the filamentous growth signalling, which could complement the filamentous growth defect of *RAS2* deletion mutant. A localisation study of nste50FAR showed that the distribution pattern of GFP-nSte50FAR is altered by induction of the HOG-pathway and these changes are influenced by PAK-like kinase Ste20. This study shows that the function of Ste50 and its RA-domain exceeds simple recruitment of pathway components to a complex and influences the strength and duration of the signal transduction.

## 6 REFERENZEN

**Andersson J, Simpson DM, Qi M, Wang Y and Elion EA. (2004)**

Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes. *EMBO J.* 23: 2564–2576.

**Bagnat M and Simons K. (2002)**

Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem.* 383: 1475-1480.

**Bao MZ, Schwartz MA, Cantin GT, Yates JR 3<sup>rd</sup> and Madhani HD. (2004)**

Pheromone-dependent destruction of the Tec1 transcription factor is required for MAP kinase signaling specificity in yeast. *Cell.* 119: 991–1000.

**Bardwell, L.J., Cook, J.G., Voora, D., Baggott, D.M., Martinez, A.R. and Thorner, J. (1998)**

Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev.* 12: 2887-2898.

**Barr, MM., Tu, H., v. Aeles, L. and Wigler, M. (1996)**

Identification of Ste4 as a potential regulator of Byr2 in the sexual response pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* 16: 5597-5603.

**Bashor CJ, Helman NC, Yan S and Lim WA. (2008)**

Using engineered scaffold interactions to reshape MAP kinase pathway signaling dynamics. *Science* 319: 1539-1543.

**Bhattacharjya S, Chen L, Broach JR and Powers S. (1995)**

Ras membrane targeting is essential for glucose signaling but not for viability in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 2984-2988.

**Bhattacharjya S, Xu P, Gingras R, Shaykhtudinov R, Wu C, Whiteway M and Ni F. (2004)**

Solution structure of the dimeric SAM domain of MAPKKK Ste11 and its interactions with the adaptor protein Ste50 from the budding yeast: implications for Ste11 activation and signal transmission through the Ste50-Ste11 complex. *J Mol Biol.* 344: 1071-1087.

**Bhattacharyya RP, Remenyi A, Yeh BJ and Lim WA (2006)**

Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu Rev Biochem.* 75: 655–680.

**Blackwell E, Kim HJ and Stone DE. (2007)**

The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *Cell Biol* 8: 44.

**Blomberg A and Adler L. (1992)**

Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol.* 33: 145-212.

**Bradford MM. (1976)**

A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

**Braus GH, Grundmann O, Brückner S and Mösch HU. (2003)**

Amino acid starvation and Gcn4p regulate adhesive growth and FLO11 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Biol Cell.* 14: 4272-84.

**Breitkreutz A, Boucher L, Breitkreutz BJ, Sultan M, Jurisica I and Tyers M. (2003)**

Phenotypic and transcriptional plasticity directed by a yeast mitogen-activated protein kinase network. *Genetics.* 165: 997–1015.

**Bruckner S, Kohler T, Braus GH, Heise B, Bolte M and Mosch HU. (2004)**

Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Curr Genet.* 46: 331–342.

**Butty AC, Pryciak ZM, Huang LS, Herskowitz I. and Peter M. (1998)**

The role of Far1 linking the heterotrimeric G-protein polarity establishment proteins during mating. *Science* 282: 1511-1516.

**Cairns BR, Ramer SW and Kornberg RD. (1992)**

Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the *STE11* kinase and the multiple phosphorylation of the *STE7* kinase. *Genes Dev.* 6: 1305-1318.

**Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prashner DC. (1994)**

Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.

**Chang CI, Xu BE, Akella R, Cobb MH and Goldsmith EJ. (2002)**

Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEK2A and activator MKK3b. *Mol Cell.* 9: 1241-1249.

**Chant J. (1999)**

Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15: 365-391.

**Chen H and Fink GR. (2006)**

Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev.* 20: 1150-1161.

**Choi KY, Satterberg B, Lyon, DM and Elion EA (1994)**

Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell.* 78: 499-512.

**Chou S, Huang L and Liu H. (2004)**

Fus3-regulated Tec1 degradation through SCFCdc4 determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell.* 119: 981-990.

**Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE and Philips MR. (1999)**

Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell.* 98: 69-80.

**Cook JG, Bardwell L, and Thorner J. (1997)**

Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* 390: 85-88.

**Crechet JB, Jacquet E, Bernardi A and Parmeggiani A. (2000)**

Analysis of the role of the hypervariable region of yeast Ras2p and its farnesylation in the interaction with exchange factors and adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 275: 17754-17761.

**Crechet JB, Cool RH, Jacquet E and Lallemand JY. (2003)**

Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Ras1p and chimaeric constructs of Ras proteins reveals the hypervariable region and farnesylation as critical elements in the adenylyl cyclase signaling pathway. *Biochemistry* 42: 14903-14912.

**Cullen PJ, Sabbagh W Jr., Graham E, Irick MM, van Olden EK, Neal C, Delrow J, Bardwell L and Sprague GF . (2004)**

A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev.* 18: 1695-1708.

**De Craene JO, Coleman J, Estrada de Martin P, Pypaert M, Anderson S, Yates JR 3rd, Ferro-Novick S and Novick P. (2002)**

Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 17: 3009-3020

**de Nadal E, Alepuz PM and Posas F. (2002)**

Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* 3: 735-740.

**Dickinson JR. (1996)**

'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology.* 142: 1391-1397.

**Dohlman HG. and Thorner JW. (2001)**

Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem.* 70:703-754.

**Dolan JW, Kirkman C and Fields S. (1989)**

The yeast *STE12* protein binds to the DNA sequence mediating pheromone induction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 5703-5707.

**Dong X, Mitchell DA, Lobo S, Zhao L, Bartels DJ and Deschenes RJ. (2003)**

Palmitoylation and plasma membrane localization of Ras2p by a nonclassical trafficking pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 23: 6574-6584.

**Drogen F, O'Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM and Peter M. (2000)**

Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol.* 10: 630-639

**Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH and Elledge SJ. (1993)**

The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7: 555-569.

**Edwards MC, Liegeois N, Horecka J, DePinho RA, Sprague GF Jr, Tyers M and Elledge SJ. (1997)**

Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far- phenotype on yeast cells. *Genetics* 147: 1063-1076.

**Elion EA, Brill JA and Fink GR. (1991)**

*FUS3* represses *CLN1* and *CLN2* and in concert with *KSS1* promotes signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 9392-9396.

**Esch RK and Errede B. (2002)**

Pheromone induction promotes Ste11 degradation through a MAPK feedback and ubiquitin-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 9160-9165.

**Esser D, Bauer B, Wolthuis RM, Wittinghofer A, Cool RH and Bayer P. (1998)**

Structure determination of the Ras-binding domain of the Ral-specific guanine nucleotide exchange factor Rlf. *Biochemistry.* 37: 13453-16462.

**Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H and Silver PA. (1998)**

Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of *HOG1* MAPK requires the importin  $\beta$  homologs *NMD5* and *XPO1*. *EMBO J.* 17: 5606-5614.

**Fichtner L, Schulze F and Braus GH. (2007)**

Differential Flo8p-dependent regulation of *FLO1* and *FLO11* for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c. *Mol Microbiol.* 66: 276-289.

**Fields S and Song O. (1989)**

A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.

**Finogold AA, Johnson DI, Farnsworth CC, Gelb MH, Judd SR, Glomset JA and Tamanoi F. (1991)**

Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the *CDC43* gene product, but not the *DPR1* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 4448-4452.

**Feng Y, Song LY, Kincaid E, Mahanty SK and Elion EA. (1998)**

Functional binding between Gbeta and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr Biol.* 8: 267-278.

**Flatauer LJ, Zadeh SF and Bardwell L. (2005)**

Mitogen-activated protein kinases with distinct requirements for Ste5 scaffolding influence signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 25: 1793-1803.

- Gagiano M, van Dyk D, Bauer FF, Lambrechts MG and Pretorius IS. (1999)**  
Msn1p/Mss10p, Mss11p and Muc1p/Flo11p are part of a signal transduction pathway downstream of Mep2p regulating invasive growth and pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 31: 103–116.
- Gagiano M, Bauer FF, Pretorius IS. (2002)**  
The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 2: 433–470.
- Gavrias V, Andrianopoulos A, Gimeno CJ and Timberlake WE. (1996)**  
*Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. Mol Microbiol. 19: 1255–1263.
- Geyer M, Herrmann C, Wohlgemuth S, Wittinghofer A and Kalbitzer HR. (1997)**  
Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signaling. Nature Struct. Biol. 4: 694–699.
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA and Fink GR. (1992)**  
Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth; regulation by starvation and *RAS*. Cell. 68: 1077–1090.
- Giniger E, Varnum SM and Ptashne M. (1985)**  
Specific DNA binding of *GAL4*, a positive regulatory protein of yeast. Cell. 40: 767–774.
- Grimshaw SJ, Mott HR, Stott KM, Nielsen PR, Evetts KA, Hopkins LJ, Nietlispach D and Owen D. (2004)**  
Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein *STE50* and analysis of its interaction with the *STE11* SAM. J Biol Chem. 279: 2192–2201
- Guedener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J and Hegemann JH. (1996)**  
A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res. 24: 2519–2524.
- Guha N, Desai P and Vancura A. (2007)**  
Plc1p is required for SAGA recruitment and derepression of Sko1p-regulated genes. Mol Biol Cell 18: 2419–2428.
- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, and Davenport K. (1998)**  
MAPK kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Mol Biol Rev. 62: 1264–1300.
- Hall JP, Cherkasova V, Elion E, Gustin MC and Winter E. (1996)**  
The osmoregulatory pathway represses mating pathway activity in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of a *FUS3* mutant that is insensitive to the repression mechanism. Mol Cell Biol. 16: 6715–6723.
- Hanahan, D. 1985**  
Techniques for Transformation of *E. coli*, In DNA Cloning, Volume I, a practical approach., IRL Press. pp. 109–135.
- Hao N, Behar M, Elston TC and Dohlman HG. (2007)**  
Systems biology analysis of G protein and MAP kinase signaling in yeast. Oncogene 26: 3254–3266.
- Hao N, Zeng Y, Elston TC and Dohlman HG. (2008)**  
Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. J Biol Chem. 283: 33798–33802.
- Hayashi M and Maeda T. (2006)**  
Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biochem. 139: 797–803.
- Herrmann C. (2003)**  
Ras-effector interactions: after one decade. Curr Opin Struc Biol. 13: 122–129.

**Herskowitz I. (1995)**

MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*. 80: 187-197

**Hicke L and Riezman H. (1996)**

Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*. 84:277-87.

**Hicke L, Zanolari B and Riezman H. (1998)**

Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J Cell Biol*. 141: 349-358.

**Hinnebusch AG and Natarajan K. (2002)**

Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell*. 1: 22-32.

**Hirayama T, Maeda T, Saito H and Shinozaki K. (1995)**

Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 249: 127-138.

**Hirschman JE and Jenness DD. (1999)**

Dual lipid modification of the yeast gamma subunit Ste18p determines membrane localization of Gbetagamma. *Mol Cell Biol*. 19: 7705-7711

**Hopp C. (2005)**

Wechselwirkungen und Phosphorylierung des Adaptorproteins Ste50 während der MAPK-vermittelten Signaltransduktion in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Huang L, Weng X, Hofer F, Martin GS and Kim SH. (1997)**

Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RaGDS. *Nat Struct Biol*. 4: 609-615

**Inouye C, Dhillon N, and Thorner J. (1997)**

Ste5 RING-H2 domain: role in Ste4 promoted oligomerization für yeast pheromone signaling. *Science*. 278: 103-106.

**Jacoby T, Flanagan H, Faykin A, Seto AG, Mattison C, Ota I. (1997)**

Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J Biol Chem*. 272: 17749-17755

**James P, Halladay J and Craig EA. (1996)**

Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*. 144: 1425-1436.

**Jansen G, Bühring F, Hollenberg CP and Ramezani Rad M. (2001)**

Mutations in the SAM domain of *STE50* differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*. 265: 102-117.

**Jansen G, Wu C, Schade B, Thomas DY and Whiteway M. (2005)**

Drag&Drop cloning in yeast. *Gene*. 344: 43-51.

**Jenness DD and Spatrick P. (1986)**

Down regulation of the alpha-factor pheromone receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*. 46: 345-353.

**Johnson LN, Noble ME and Owen DJ. (1996)**

Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*. 85: 149-158.

**Johnson DI. (1999)**

Cdc42: An Essential Rho-Type GTPase Controlling Eukaryotic Cell Polarity. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63: 54-105.

**Johnston M. (1987)**

A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol Rev. 51: 458-476.

**Katoka T, Powers S, McGill C, Fasano O, Strathern J, Broach J and Wigler M. (1984)**

Genetic analysis of *RAS1* and *RAS2* genes. Cell. 37: 437-445.

**Kido M, Shima F, Satoh T, Asato T, Kariya K and Kataoka T. (2002)**

Critical function of the Ras-associating domain as a primary Ras-binding site for regulation of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase. J Biol Chem. 277: 3117-3123.

**Kiel C, Wohlgemuth S, Rousseau F, Schymkowitz J, Ferkinghoff-Borg J, Wittinghofer F and Serrano L. (2005)**

Recognizing and defining true Ras binding domains II: in silico prediction based on homology modelling and energy calculations. J Mol Biol. 348: 759-775.

**Klein S, Reuveni H and Levitzki A. (2000)**

Signal transduction by a nondissociable heterotrimeric yeast G protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 3219-3223.

**Klosterman SJ, Martinez-Espinoza AD, Andrews DL, Seay JR and Gold SE. (2008)**

Ubc2, an ortholog of the yeast Ste50p adaptor, possesses a basidiomycete-specific carboxy terminal extension essential for pathogenicity independent of pheromone response. Mol Plant Microbe Interact. 21: 110-21.

**Kohler T, Wesche S, Taheri N, Braus GH and Mosch HU. (2002)**

Dual role of the *Saccharomyces cerevisiae* TEA/ATTS family transcription factor Tec1p in regulation of gene expression and cellular development. Eukaryot Cell. 1: 673-686.

**Kron SJ, Styles CA and Fink GR. (1994)**

Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell. 5: 1003-1022.

**Kronstad JW, Holly JA and MacKay VL. (1987)**

A yeast operator overlaps an upstream activation site Cell. 50: 369-377.

**Kuroda Y, Suzuki N and Kataoka T. (1993)**

The effect of posttranslational modifications on the interaction of Ras2 with adenylyl cyclase. Science. 259: 683-686

**Kwan JJ, Warner N, Pawson T and Donaldson LW. (2004)**

The solution structure of the *S. cerevisiae* Ste11 MAPKKK SAM domain and its partnership with Ste50. J Mol Biol. 342: 681-693

**Kyba M and Brock HW. (1998)**

The SAM domain of polyhomeotic, RAE28, and scm mediates specific interactions through conserved residues. Dev Genet. 22: 74-84.

**Laemmli UK. (1970)**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-705.

**Laloux I, Jacobs E and Dubois E. (1994)**

Involvement of SRE element of Ty1 transposon in *TEC1* dependent transcriptional activation. Nucleic Acids Res. 22: 999-1005.

**Lamson RE, Winters MJ and Pryciak PM. (2002)**

Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. Mol Cell Biol. 22:2939-2951.

**Leberer E, Dignard D, Harcus D, Hougan L, Whiteway M and Thomas DY. (1993)**

Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* *STE5* as a suppressor of a *STE20* protein kinase mutant: structural and functional similarity of *STE5* with *FAR1*. Mol Gen Genet. 241: 241-254.

- Leberer E, Wu CL, Leeuw T, Fourestlieuvin A, Segall JE and Thomas DY. (1997)**  
Functional characterization of the Cdc42 binding domain of yeast Ste20 protein kinase. *EMBO J.* 6: 53-97.
- Lemaire K, Van de Velde S, Van Dijck P and Thevelein JM. (2004)**  
Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 16: 293-299.
- Linnemann T, Kiel C, Herter P and Herrmann C. (2002)**  
The activation of RalGDS can be achieved independently of its Ras binding domain. Implications of an activation mechanism in Ras effector specificity and signal distribution. *J Biol Chem.* 277: 7831-7837
- Lisziewicz J, Godany A, Förster HH and Küntzel H. (1987)**  
Isolation and nucleotide sequence of a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase gene suppressing the cell cycle start mutation *cdc25*. *J Biol Chem.* 262: 2549-2553.
- Liu H, Styles CA and Fink GR. (1996)**  
*Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics.* 144: 967-978.
- Liu H, Styles CA and Fink G. (1993)**  
Element of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science.* 262: 1741-1744.
- Lo WS and Dranginis AM. (1998)**  
The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphal formation and invasion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 9: 161-171.
- Lo WS, Raites EI and Dranginis AM. (1997)**  
Development of pseudohyphae by embedded haploid and diploid yeast. *Curr Genet.* 32: 197-202.
- Loewen CJ, Young BP, Tavassoli S and Levine TP. (2007)**  
Inheritance of cortical ER in yeast is required for normal septin organization. *J Cell Biol.* 179: 467-483.
- Lorenz MC and Heitman J. (1998)**  
The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17: 1236-1247.
- Lorenz MC, Cutler NS and Heitman J. (2000)**  
Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 11: 183-199.
- Lorenz MC, Pan X, Harashima T, Cardenas ME, Xue Y, Hirsch JP and Heitman J. (2000)**  
The G protein-coupled receptor gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 154: 609-622.
- Ma P, Cook JG and Thorner J. (1995)**  
Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol Biol Cell.* 6: 889-909.
- Madhani HD and Fink GR. (1997)**  
Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science.* 275: 1314-1317.
- Madhani HD, Styles CA and Fink GR. (1997)**  
MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell.* 91: 673-684.
- Maeda T, Wurgler-Murphy SM and Saito H. (1994)**  
A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature.* 369: 242-245.

**Maeda T, Takekawa M and Saito H. (1995)**

Activation of yeast *PBS2* MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*. 269: 554-558.

**Maeder CI, Hink MA, Kinkhabwala A, Mayr R, Bastiaens PI and Knop M. (2007)**

Spatial regulation of Fus3 MAP kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling. *Nat Cell Biol*. 9: 1319-1326

**Maleri S, Ge Q, Hackett EA, Wang Y, Dohlman HG and Errede B. (2004)**

Persistent activation by constitutive Ste7 promotes Kss1-mediated invasive growth but fails to support Fus3-dependent mating in yeast. *Mol Cell Biol*. 24: 9221-9238.

**Maltese WA. and Sheridan KM. (1990)**

Isoprenoid modification of G25K (Gp), a low molecular mass GTP-binding protein distinct from p21ras. *J Biol Chem*. 265: 17883-17890.

**Marcus S, Polverino A, Barr M and Wigler M. (1994)**

Complexes between *STE5* and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 7762-7766.

**Manahan CL, Patnana M, Blumer KJ and Linder ME. (2000)**

Dual lipid modification motifs in G(alpha) and G(gamma) subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 11: 957-968.

**Matsubara K, Kishida S, Matsuura Y, Kitayama H, Noda M and Kikuchi A. (1999)**

Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral activation. *Oncogene*. 18: 1303-1312

**Miller J. (1972)**

Experiments in Molekular Genetics, Cold Spring Harbor Labatory, Cold Spring Harbor, NY

**Mösch HU, Roberts RL and Fink GR. (1996)**

Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase moduls to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 5352-5356.

**Mösch HU, Kubler E, Krappmann S, Fink GR and Braus GH. (1999)**

Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein Kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 10: 1325-1335.

**Mukai Y, Harashima S and Oshima Y. (1993)**

Function of the signal transduction pathway for mating pheromone sustains *MAT* alpha 1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 13: 2050-2060.

**Nakayama N, Miyajima A and Arai K. (1985)**

Nucleotide sequences of *STE2* and *STE3*, cell type-specific sterile genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 4: 2643-2648.

**Nern A and Arkowitz RA. (1999)**

A Cdc24p-Far1p-Gbetagamma protein complex required for yeast orientation during mating. *J Cell Biol*. 144: 1187-1202.

**Norbeck J, Pahlmann AK, Akhtar N, Blomberg A and Adler L. (1996)**

Purification and characterization of two isoenzymes of DL-glyzerol-3-phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of the corresponding *GPP1* and *GPP2* genes and evidence for osmotic regulation of Gpp2p expression by the osmosensing mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 271:12875-12881.

**Norman TC, Smith DL, Sorger PK, Drees BL, O'Rourke SM, Hughes TR, Roberts CJ, Friend SH, Fields S and Murray AW. (1999)**

Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways. *Science*. 285: 591-595.

**O'Rourke SM. and Herskowitz I. (1998)**

The Hog1p MAPK prevents crosstalk between the HOG and pheromone response pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 12: 2874-2886.

**O'Rourke SM and Herskowitz I. (2002)**

A third osmosensing branch in *Saccharomyces cerevisiae* requires the Msb2 protein and functions in parallel with the Sho1 branch. *Mol Cell Biol.* 22: 4739-4749.

**O'Shea EK and Herskowitz I. (2000)**

The ins and outs of cell-polarity decisions. *Nat Cell Biol.* 2: 39-41.

**Ota IM and Varshavsky A. (1993)**

A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science.* 262:566-569.

**Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF and Williams RL. (2000)**

Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell.* 103: 931-943.

**Pan X and Heitman J. (1999)**

Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19: 4874-4887.

**Park G, Xue C, Zhao X, Kim Y, Orbach M and Xu JR. (2006)**

Multiple upstream signals converge on the adaptor protein Mst50 in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* 10: 2822-2835.

**Park SH, Zarrinpar A and Lim WA. (2003)**

Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science.* 299: 1061-1064.

**Pascual-Ahuir A, Serrano R and Proft M. (2001)**

The Sko1p repressor and Gcn4p activator antagonistically modulate stress-regulated transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 21: 16-25.

**Peter M, Neiman AM, Park HO, van Lohuizen M and Herskowitz I. (1996)**

Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J.* 15: 7046-7059.

**Phizicky EM and Fields S. (1995)**

Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev.* 59: 94-123.

**Ponting CP. (1995)**

SAM: a novel motif in yeast sterile and *Drosophila* polyhomeotic proteins. *Protein Sci.* 4: 1928-1930.

**Ponting CP and Benjamin DR. (1996)**

A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci.* 21: 422-425.

**Poplinski A, Hopp C and Ramezani-Rad M. (2007)**

Ste50 adaptor protein influences Ras/cAMP-driven stress-response and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet.* 4: 257-68

**Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. (1996)**

Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* two-component " osmosensor. *Cell.* 86: 865-875.

**Posas F and Saito H. (1997)**

Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science.* 276: 1702-1705

**Posas F and Saito H. (1998)**

Activation of the yeast *SSK2* MAP kinase kinase kinase by the *SSK1* two-component response regulator. *EMBO J.* 17: 1385-1394.

**Posas F, Witten EA and Saito H. (1998)**

Requirement of *STE50* for osmostress-induced activation of the *STE11* mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol.* 18: 5788-5796

- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC and Saito H. (1996)**  
Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*. 86: 865-875
- Printen JA and Sprague GF Jr. (1994)**  
Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics*. 138: 609-619.
- Proft M, Pascual-Ahuir A, de Nadal E, Arino J, Serrano R and Posas F. (2001)**  
Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J*. 20: 1123-1133.
- Proft M and Serrano R. (1999)**  
Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol*. 19: 537-546.
- Proft M and Struhl K. (2002)**  
Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Mol Cell*. 9: 1307-1317
- Proft M and Struhl K. (2004)**  
MAP kinase-mediated stress relief that precedes and regulates the timing of transcriptional induction. *Cell*. 118: 351-361.
- Pryciak PM and Huntress FA. (1998)**  
Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev*. 12: 2684-2697.
- Qi M and Elion EA. (2005)**  
Formin-induced actin cables are required for polarized recruitment of the Ste5 scaffold and high level activation of MAPK Fus3. *J Cell Sci*. 118: 2837-2848.
- Raitt DC, Posas F and Saito H. (2000)**  
Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J*. 19: 4623-4631.
- Ramachander R and Bowie JU. (2004)**  
SAM domains can utilize similar surfaces for the formation of polymers and closed oligomers. *J Mol Biol*. 342: 1353-1358.
- Ramer SW and Davis RW. (1993)**  
A dominant truncation allele identifies a gene, *STE20*, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 452-456.
- Ramezani-Rad M, Xu G and Hollenberg CP. (1992)**  
*STE50*, a novel gene required for activation of conjugation at an early Step in mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 236: 145-154.
- Ramezani-Rad M, Jansen G, Bühring F and Hollenberg CP. (1998)**  
Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol Gen Genet*. 259: 29-38.
- Reiser V, Salah SM and Ammerer G. (2000)**  
Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol*. 2: 620-627.
- Richman TJ, Sawyer MM and Johnson DI. (2002)**  
*Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p Localizes to Cellular Membranes and Clusters at Sites of Polarized Growth. *Eukaryot Cell*. 1: 458-468.
- Roberts RL and Fink GR. (1994)**  
Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev*. 8: 2974-2985.

**Rost B. (1996)**

PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* 266: 525-539

**Roth AF, Sullivan DM and Davis NG. (1998)**

A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast  $\alpha$ -factor receptor. *J Cell Biol.* 142: 949-961.

**Rottmann M, Dieter S, Brunner H and Rupp S. (2003)**

A screen in *Saccharomyces cerevisiae* identified CaMCM1, an essential gene in *Candida albicans* crucial for morphogenesis. *Mol Microbiol.* 47: 943-959.

**Rupp S, Summers E, Lo H-J., Madhani H and Fink G. (1999)**

MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* 18: 1257-1269.

**Sabbagh W Jr., Flatauer LJ, Bardwell AJ and Bardwell L. (2001)**

Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell.* 8: 683-691.

**Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989)**

*Molecular Cloning: A laboratory manual*, Ed. 2; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

**Schwartz MA and Madhani HD. (2006)**

Control of MAPK signaling specificity by a conserved residue in the MEK-binding domain of the yeast scaffold protein Ste5. *Curr Genet.*;49:351-63.

**Sengupta N, Vinod PK and Venkatesh KV. (2007)**

Crosstalk between cAMP-PKA and MAP kinase pathways is a key regulatory design necessary to regulate *FLO11* expression. *Biophys Chem.* 125: 59-71

**Slaughter BD, Huff JM, Wiegraebe W, Schwartz JW and Li R. (2008)**

SAM domain-based protein oligomerization observed by live-cell fluorescence fluctuation spectroscopy. *PLoS ONE.* 3: 1931.

**Spode I. (2003)**

Untersuchungen zur Modifikation von Ste50p in der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Stanhill A, Schick N and Engelberg D. (1999)**

The yeast ras/cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress response. *Mol Cell Biol.* 19: 7529-7538.

**Swiegers JH, Pretorius IS and Bauer FF. (2006)**

Regulation of respiratory growth by Ras: the glyoxylate cycle mutant, *cit2Delta*, is suppressed by *RAS2*. *Curr Genet.* 50: 161-171.

**Tamaki H, Miwa T, Shinozaki M, Saito M, Yun CW, Yamamoto K, Kumagai H. (2000)**

*GPR1* regulates filamentous growth through *FLO11* in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 267: 164-168.

**Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E and Saito H. (2006)**

Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* 25: 3033-3044.

**Tatebayashi K, Tanaka K, Yang HY, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M and Saito H. (2007)**

Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.* 26: 3521-3533.

**Truckses DM, Bloomekatz JE and Thorner J. (2006)**

The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 26: 912–928.

**Trueheart J. and Fink GR. (1989)**

The yeast cell fusion protein *FUS1* is O-glycosylated and spans the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 9916–9920.

**Van Nuland A, Vandormael P, Donaton M, Alenquer M, Lourenco A, Quintino E, Versele M and Thevelein JM. (2006)**

Ammonium permease-based sensing mechanism for rapid ammonium activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Mol Microbiol.* 59: 1485–1505.

**Vetter IR, Linnemann T, Wohlgemuth S, Geyer M, Kalbitzer HR, Herrmann C and Wittinghofer A. (1999)**

Structural and biochemical analysis of Ras-effector signaling via RalGDS. *FEBS Lett.* 451: 175–180.

**Vinod PK and Venkatesh KV. (2007)**

Specificity of MAPK signaling towards *FLO11* expression is established by crosstalk from cAMP pathway. *Syst Synth Biol.* 1: 99–108.

**Vyas VK, Kuchin S, Berkey CD and Carlson M. (2003)**

Snf1 kinases with different beta-subunit isoforms play distinct roles in regulating haploid invasive growth. *Mol Cell Biol.* 23: 1341–1348.

**Wang Y and Dohlman HG. (2002)**

Pheromone-dependent ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase Ste7. *J Biol Chem.* 277: 15766–15772.

**Wang Y and Elion EA. (2003)**

Nuclear export and plasma membrane recruitment of the Ste5 scaffold are coordinated with oligomerization and association with signal transduction components. *Mol Biol Cell.* 14: 2543–2558.

**Warmka J, Hanneman J, Lee J, Amin D and Ota I. (2001)**

Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol.* 21: 51–60

**Westfall PJ and Thorner J. (2006)**

Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. *Eukaryot Cell.* 5: 1215–1228.

**Whiteway MS and Thomas DY. (1994)**

Site-directed mutations altering the CAAX box of Ste18, the yeast pheromone-response pathway G gamma subunit. *Genetics.* 137: 967–976.

**Widmann C, Gibson S, Jarpe MB and Johnson GL. (1999)**

Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79: 143–180.

**Wiget P, Shimada Y, Butty AC, Bi E and Peter M. (2004)**

Site-specific regulation of the GEF Cdc24p by the scaffold protein Far1p during yeast mating. *EMBO J.* 23: 1063–1074.

**Wittinghofer A and Nassar N. (1996)**

How Ras-related proteins talk to their effectors. *Trends Biochem Sci.* 21: 488–491.

**Wohlgemuth S, Kiel C, Krämer A, Serrano L, Wittinghofer F and Herrmann C. (2005)**

Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *J Mol Biol.* 348: 741–758.

**Wu C, Whiteway M, Thomas DY and Leberer E. (1995)**

Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 270: 15984-15992.

**Wu C, Leberer E, Thomas DY, Whiteway M. (1999)**

Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 10: 2425-2440.

**Wu C, Arcand M, Jansen G, Zhong M, Iouk T, Thomas DY, Meloche S and Whiteway M. (2003)**

Phosphorylation of the MAPKKK regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function. *Eukaryot Cell.* 2: 949-961.

**Wu C, Jansen G, Zhang J, Thomas DY and Whiteway M. (2006)**

Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev.* 20: 734-746.

**Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA and Saito H. (1997)**

Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Hog1 mitogen-activated protein kinase by the Ptp2 and Ptp3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol.* 17: 1289-1297.

**Xu G, Jansen G, Thomas DY, Hollenberg CP and Ramezani-Rad M. (1996)**

Ste50p sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 20: 773-783

**Xue Y, Batlle M and Hirsch JP. (1998)**

GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Galpha subunit and functions in a Ras-independent pathway. *EMBO J.* 17: 1996-2007.

**Yamane HK, Farnsworth CC, Xie H, Evans T, Howald W, Gelb MH, Glomset JA, Clarke S and Fung BK. (1991)**

The membrane binding domain of the small G-protein G25K contains an alltrans geranylgeranyl cysteinyl methyl ester at its carboxyl terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 286-290.

**Yuan YL and Fields S. (1991)**

Properties of the DNA-binding domain of the *Saccharomyces cerevisiae* STE12 protein. *Mol Cell Biol.* 11: 5910-5918.

**Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Nittler MP and Lim WA. (2004)**

Sho1 and Pbs2 Act as Coscaffolds Linking Components in the Yeast High Osmolarity MAP Kinase Pathway. *Mol Cell.* 14: 825-832.

**Zeitlinger J, Simon I, Harbison CT, Hannett NM, Volkert TL, Fink GR and Young RA. (2003)**

Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signalling. *Cell.* 113: 395-404.

# 7 ANHANG

## DATA DOCUMENTATION SHEET 1

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

**Origin**

### A. Identification of gene

1) **Label:** HGX10

2) **Strain background:** W303-1A

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100

**Created one**

1) **Label:** HNB210

2) **Strain background:** W303-1A

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 opy2::loxP-HIS3-loxP

4) **Systematic name of ORF:** YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

### A. Replacement Strategy:

SFH-PCR       LFH-PCR       cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

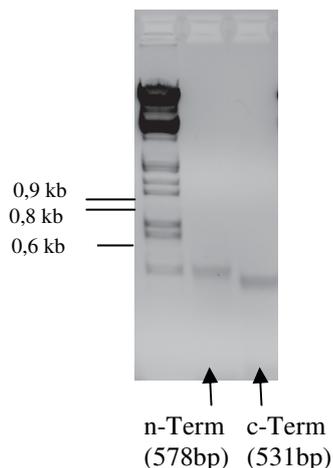
Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

### B. Verification:

**(x) Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACCTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	ccgagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

PROVIDE PICTURE OF GEL



DATA DOCUMENTATION SHEET 2

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

**Origin**

**A. Identification of gene**

1) **Label: HFB 95**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 hog1::TRP1

**Created one**

1) **Label: HNB212**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 hog1::TRP1  
 opy2::loxP-HIS3-loxP

4) **Systematic name of ORF:** YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

**A. Replacement Strategy:**

( x ) SFH-PCR ( ) LFH-PCR ( ) cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

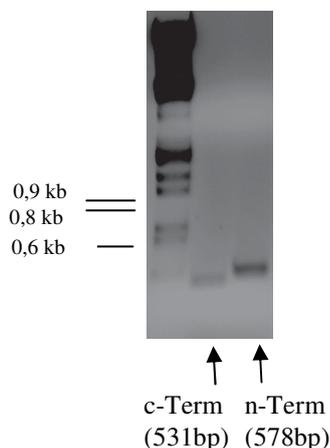
Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

**B. Verification:**

(x) **Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	ccgagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

PROVIDE PICTURE OF GEL



DATA DOCUMENTATION SHEET 3

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

**Origin**

**A. Identification of gene**

1) **Label: HCH129**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa *leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3 ssk1::kan*

**Created one**

1) **Label: HNB213**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa *leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3 ssk1::kan opy2::loxP-HIS3-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

**A. Replacement Strategy:**

( x ) SFH-PCR ( ) LFH-PCR ( ) cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

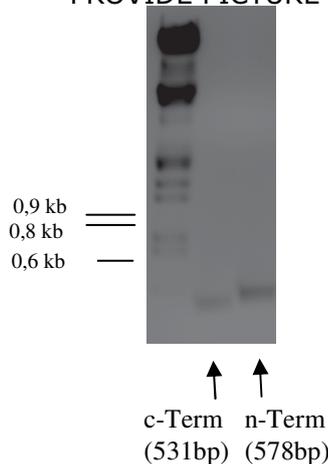
Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

**B. Verification:**

(x) **Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACCTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	cggagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

PROVIDE PICTURE OF GEL



DATA DOCUMENTATION SHEET 4

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

**Origin**

**A. Identification of gene**

1) **Label:** HCH92

2) **Strain background:** W303-1A

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ssk1::kan

**Created one**

1) **Label:** HNB213

2) **Strain background:** W303-1A

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ssk1::kan  
 opy2::loxP-HIS3-loxP

4) **Systematic name of ORF:** YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

**A. Replacement Strategy:**

( x ) SFH-PCR ( ) LFH-PCR ( ) cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

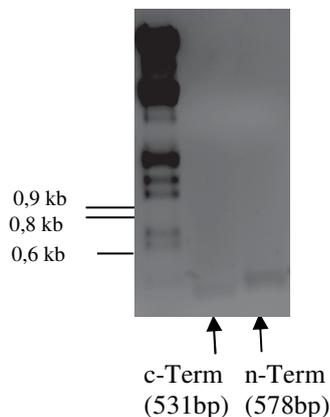
Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

**B. Verification:**

(x) **Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACCTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	ccgagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

PROVIDE PICTURE OF GEL



DATA DOCUMENTATION SHEET 5

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

**Origin**

**A. Identification of gene**

1) **Label: HNB165**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa *leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3:Myc-nste50FAR::KAN*

**Created one**

1) **Label: HNB216**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa *leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3::Myc-nste50FAR::KAN opy2::loxP-HIS3-loxP*

4) **Systematic name of ORF:** YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

**A. Replacement Strategy:**

( x ) SFH-PCR ( ) LFH-PCR ( ) cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

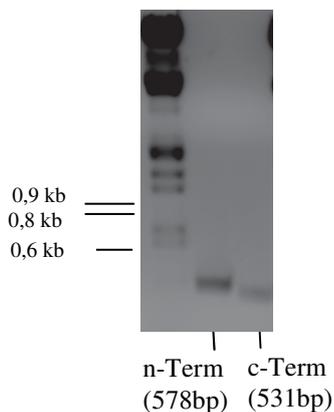
Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

**B. Verification:**

(x) **Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	cggagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

PROVIDE PICTURE OF GEL



DATA DOCUMENTATION SHEET 6

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

**Origin**

**A. Identification of gene**

1) **Label: HNB167**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3:Myc-nste50FAR::KAN ssk1::kan

**Created one**

1) **Label: HNB218**

2) **Strain background: W303-1A**

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 ste50::ura3::Myc-nste50FAR::KAN ssk1::kan opy2::loxP-HIS3-loxP

4) **Systematic name of ORF:** YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

**A. Replacement Strategy:**

( x ) SFH-PCR ( ) LFH-PCR ( ) cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

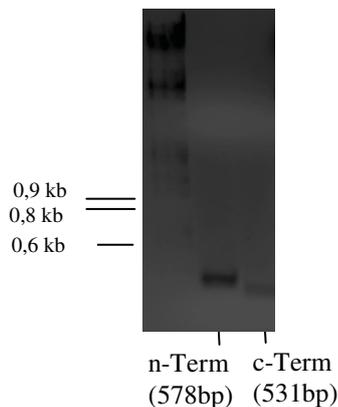
Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

**B. Verification:**

(x) **Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	cggagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

PROVIDE PICTURE OF GEL



DATA DOCUMENTATION SHEET 7

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

**Origin**

**A. Identification of gene**

1) **Label:** HF894

2) **Strain background:** W303-1A

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 hog1::TRP1

**Created one**

1) **Label:** HNB204

2) **Strain background:** W303-1A

3) **Genotype:** MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100 hog1::TRP1  
 opy2::loxP-HIS3-loxP

4) **Systematic name of ORF:** YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

**A. Replacement Strategy:**

( x ) SFH-PCR ( ) LFH-PCR ( ) cloned replacement cassette

Replacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

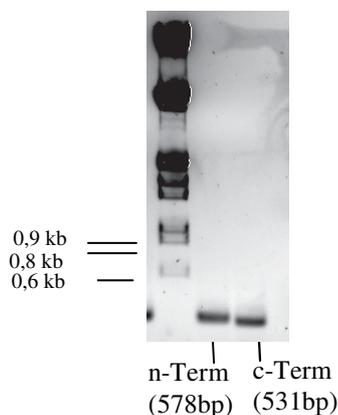
Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

**B. Verification:**

(x) **Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	ccgagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

PROVIDE PICTURE OF GEL



## DATA DOCUMENTATION SHEET 8

A. Identification of gene replacement strategy

B. Verification of gene replacement

Origin

**A. Identification of gene**

1) Label: HF750

2) Strain background: MR12

3) Genotype: MATa *leu2::hisG; ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2*

Created one

1) Label: HNB287

2) Strain background: MR12

3) Genotype: MATa *leu2::hisG; ura3-52; leu2::FLO11lacZ-LEU2::leu2 TRP1*  
*opy2::loxP-HIS3-loxP*4) Systematic name of ORF: YPR075C *OPY2* on chromosome XVI .....

Chromosomal coordinates: 696816 to 695734 size of ORF: 1083..... (bp)

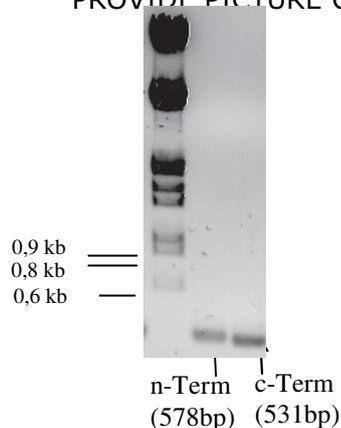
**A. Replacement Strategy:**() SFH-PCR () LFH-PCR () cloned replacement cassetteReplacement marker: loxP-HIS3 loxP Position and number of bp replaced from  
ORF (A of ATG = 1). From 1 to 1083 replaced: 1083 (bp)

Number of remaining original ORF nucleotides. 5': 0... 3' 0 (inclusive of stop codon)

**B. Verification:****(x) Analytical PCR** (provide copy of gel and indicate size marker)

Primer	Primer sequence	Size of PCR-Fragment
A1 A260 kanB	ggatgtatgggctaaatg	
A2 A261 kanC	cctcgacatcatctgccc	
K1 A320opy2T300	CTGCTGCGGAACCTTATCC	A2-K1 (531bp)
K2 A321OPY2P439	ccgagctcCCGAACCAGGTGATCAGC	A1-K2 (578bp)

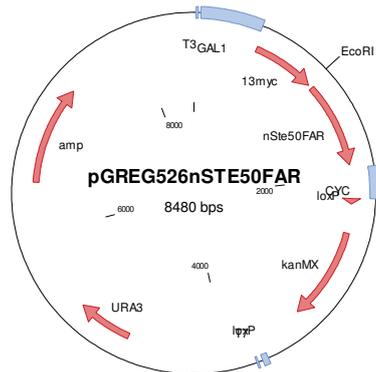
PROVIDE PICTURE OF GEL



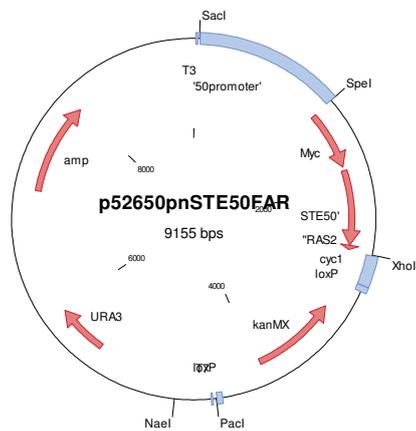
## Anhang 9

**Plasmidkarten der nste50FAR Plasmide**

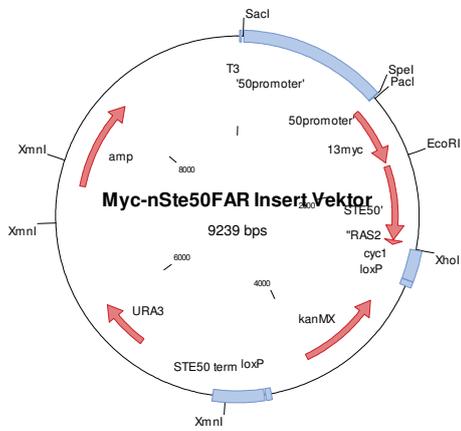
Plasmidkarte von ENB71. Der ORF von nste50FAR wurde mittels in vivo Rekombination an den rec1 und rec2 Regionen eingefügt.



Plasmidkarte von ENB111. Der *GAL*-Promotor von pGREG526 (EWK75) wurde durch den *STE50* Promotor (ELS383) aus durch Restriktion mit *SacI*/*SpeI* und anschliessender Ligation ersetzt.



Plasmidkarte von ENB187. Der *STE50* Terminator (419bp) wurde mittels in vivo rekombination hinter die loxP-kan MX-loxP Kasette eingefügt. Das Plasmid ENB111 wurde hierfür mit *NaeI* linearisiert. Zur Integration ins Hefe Genom wurde der Plasmid mit *SacI/XmnI* geschnitten.



## ABKÜRZUNGEN

AD	Aktivierungsdomäne
ADE	Adenin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
3-AT	3-Amino-1H-1,2,4-triazole
BCIP	Brom-Chlor-Indolylphosphat
bP	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CEN	Centromer
CIP	Calf Intestine alkaline Phosphatase
cAMP	zyklisches Adenin- Monophosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FRE	Filamentous response element
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde
HIS	Histidin
HMW	High-Molecular-Weight
HOG	High osmolarity glycerol
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium für <i>E. coli</i>
LEU	Leucin
M, mM, $\mu$ M	Molar, Millimolar, Mikromolar
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml, l, $\mu$ l	Milliliter, Liter, Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
ONPG	2-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pH	potentia Hydrogenii (Säurestärke)
PRE	pheromone response element
RAD	Ras association domain
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid

---

rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SC	Synthetic Complete
SD	Synthetisches Medium
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
STRE	stress response element
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	Tryptophan
URA	Uracil
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
YEPD	Hefe-Vollmedium
YNB	Yeast nitrogen base

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Professor Dr. Massoud Ramezani-Rad für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung während der Arbeit, die anregenden Diskussionen und seinen besonderen Einsatz während der Betreuung und Korrektur meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Professor Dr. Jaeger für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Anna Nagy danke ich dafür, dass immer alles in perfekter Ordnung war, Kolben und Reagenzgläser immer vorhanden waren und sie heimlich immer wieder aufgeräumt hat.

Ich danke dem Institut für Mikrobiologie für alle Hilfe und Tips die man über die Jahre annimmt, und das über das kollegiale hinaus gehende Arbeitsklima. Ihnen möchte ich im Sinne der Mittagspause mitgeben: „Manduca, iam coctum est“

Ich danke sehr gerne den jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Rad, Anja Saran, Zheng Hu, Claudia Hopp, Igo Spode, Bettina Axler, Bernd Pothoff, Andreas Poplinski, Harald Bielig und André Cohnen für die gute Zusammenarbeit und dafür dass ich mich in der Arbeitsgruppe wohl fühlte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie – Pia, weil sie mich trägt und antreibt - meinen Eltern, weil sie mich in meinem Leben immer unterstützt haben - Julia und Denis, die mir schon so viele Jahre Hilfe und Anrechnerpartner sind.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit selbstständig und mit keinen anderen als den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, März 2009