

**Untersuchungen zur Regulation  
der Zellintegrität in  
Hefen**

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

vorgelegt von  
Anja Lorberg  
aus Krefeld

Düsseldorf  
2000

---

# INHALTSVERZEICHNIS

## **1. EINLEITUNG** **1**

---

1.1 MAP-Kinase-Wege in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.1.1 Der Zellintegritätsweg	2
1.1.1.1 Der Aufbau der Zellwand	3
1.1.1.2 Die Proteinkinase C	6
1.1.1.3 Das MAP-Kinase-Modul des Weges	7
1.1.1.4 Sensoren und Aktivatoren des Weges	9
1.1.1.5 Andere Funktionen von Rho1p	12
1.1.1.6 Ziele des MAP-Kinase-Moduls	12
1.1.1.6.1 Direkte Zielproteine	12
1.1.1.6.2 Transkriptionell regulierte Gene	13
1.1.1.7 Negativ-regulierende Faktoren des Weges	14
1.1.2 Andere MAP-Kinase Wege in <i>S.cerevisiae</i>	14
1.2 Wechselwirkungen mit dem Pkc1p-Weg	15
1.2.1 Quervernetzungen mit anderen MAP-Kinase-Wegen	15
1.2.1.1 Quervernetzungen mit dem "Pheromon response"-Weg	16
1.2.1.2 Wechselwirkungen mit dem HOG-Weg	16
1.2.1.3 Funktionen in Zusammenhang mit dem "SVG"-Weg	17
1.2.2 Andere Wechselwirkungen des Pkc1p-Weges	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	18

## **2. MATERIAL UND METHODEN** **19**

---

2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Antikörper	19
2.1.1.1 Chemikalien	19
2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.1.3 Enzyme	20
2.1.1.4 Verwendete Antikörper	20
2.1.2 Stämme und Medien	21
2.1.2.1 Hefestämme	21
2.1.2.1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	21
2.1.2.1.2 <i>Kluyveromyces lactis</i> -Stämme	26
2.1.2.2 Medien zur Anzucht der Hefestämme	26
2.1.2.3 Lagerung der Hefestämme	26
2.1.2.4 Bakterienstämme	26
2.1.2.4.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	26
2.1.2.5 Medien zur Anzucht der Bakterien	27
2.1.2.6 Lagerung der Bakterienstämme	27
2.1.3 Verwendete Plasmide und Genbanken	27
2.1.3.1 Ausgangsplasmide	27
2.1.3.1.1 Bakterienplasmide	27
2.1.3.1.2 Hefepasmide	28
2.1.3.2 Plasmidkonstruktionen dieser Arbeit	31
2.1.3.2.1 Bakterienplasmide	31
2.1.3.2.2 Hefepasmide	32
2.1.3.3 Plasmide zur Sequenzierung des <i>ROM2</i> -Gens	35
2.1.3.4 Verwendete Transposon-Genbank	35
2.1.4 Verwendete Oligonukleotide	35
2.1.4.1 Oligonukleotide zur Klonierung, PCR-Überprüfung oder Sequenzierung	36
2.1.4.2 Oligonukleotide zur Herstellung von Deletionen in <i>S.cerevisiae</i>	38
2.1.4.3 Oligonukleotide zur Sequenzierung des <i>ROM2</i> -Gens	38
2.1.5 Verwendete Puffer	39
2.2 Methoden	39

---

---

2.2.1 Transformationen	39
2.2.1.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	39
2.2.1.2 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.2.2 Herstellung von <i>S.cerevisiae</i> -Deletionsstämmen	39
2.2.2.1 Herstellung von Deletionsstämmen	39
2.2.2.2 Eliminierung der <i>KanMX</i> -Kassette	39
2.2.3 Herstellung von diploiden <i>S.cerevisiae</i> -Stämmen	40
2.2.3.1 Herstellung von diploiden <i>S.cerevisiae</i> -Stämmen über Kreuzung	40
2.2.3.2 Herstellung von diploiden <i>S.cerevisiae</i> -Stämmen durch induzierten Paarungstyp-Wechsel	40
2.2.4 Sporulation, Tetradenpräparation und Paarungstyp-Analyse	41
2.2.5 Erstellung serieller Verdünnungsreihen zur Wachstumsanalyse	41
2.2.6 Identifizierung des Integrationsortes von Transposons	41
2.2.6.1 Isolierung von Transposon-flankierenden Sequenzen über Integration des Plasmides YIp5	41
2.2.6.2 Isolierung von Transposon-flankierenden-Sequenzen über "Semi-Random"-PCR (ST-PCR)	42
2.2.7 Präparation von Nukleinsäuren	43
2.2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	43
2.2.7.1.1 Plasmid-Isolierung aus <i>E.coli</i> über "Alkalische Lyse" ["Minipräparation"]	43
2.2.7.1.2 Plasmid-Isolierung aus <i>E.coli</i> mittels "High Pure Plasmid Isolation Kit"	44
2.2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S.cerevisiae</i> (Robzyk und Kassir, 1992)	44
2.2.7.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	44
2.2.7.4 Isolierung von Nukleinsäure-Fragmenten aus Agarose-Gelen	45
2.2.7.5 Reinigung von PCR-Fragmenten	45
2.2.8 Restriktion von Nukleinsäuren	45
2.2.9 Dephosphorylierung von Nukleinsäure-Fragmenten	45
2.2.10 DNA-Ligation	45
2.2.11 Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten mit Hilfe von Gelelektrophoresen	45
2.2.11.1 Auftrennung in nativen Agarose-Gelen	45
2.2.11.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gele zur Sequenzierung	45
2.2.12 Nicht-radioaktive Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin	46
2.2.13 DNA-DNA-Hybridisierung ["Southern-Blot"-Analyse] und Detektion	46
2.2.14 Radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA	46
2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion [PCR]	46
2.2.16 Analyse von Proteinen	47
2.2.16.1 Herstellung von Hefe-Rohextrakten	47
2.2.16.1.1 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zur Bestimmung von $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten	47
2.2.16.1.2 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zum Nachweis des Mpk1-Proteins bzw. seiner phosphorylierten Form in <i>S.cerevisiae</i>	47
2.2.16.1.3 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zum Nachweis des überproduzierten KIMpk1-Proteins in <i>K.lactis</i> und in <i>S.cerevisiae</i>	48
2.2.16.1.4 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zum Nachweis der phosphorylierten Form des Mpk1-Proteins in <i>K.lactis</i>	48
2.2.16.2 Bestimmungen von Proteinkonzentrationen	48
2.2.16.2.1 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode	48
2.2.16.2.2 Proteinbestimmung nach der Microbiuret-Methode	49
2.2.16.3 Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten	49
2.2.16.3.1 Qualitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität mittels "Overlay-Assay"	49
2.2.16.3.2 Quantitative Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität	49
2.2.16.4 Aufreinigung von GST-Rho1p mittels Glutathion-Sepharose	50
2.2.16.4.1 Herstellung von Rohextrakten	50
2.2.16.4.2 Gemeinsame Aufreinigung von GST-Rho1p und Lrg1p-13myc	50
2.2.16.5 Ko-Immunpräzipitation des Lrg1-Proteins mit dem Rho1-Protein	50
2.2.16.6 Nachweis spezifischer Proteine durch Westernblot-Analyse	51
2.2.16.6.1 Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
2.2.16.6.2 Transfer von Proteinen auf Membranen	51
2.2.16.6.3 Nachweis von phosphoryliertem Mpk1-Protein von <i>S.cerevisiae</i>	51
2.2.16.6.4 Nachweis von phosphoryliertem Mpk1-Protein von <i>K.lactis</i>	52
2.2.16.6.5 Nachweis des Mpk1-Proteins von <i>S.cerevisiae</i>	52
2.2.16.6.6 Nachweis des Mpk1-Proteins von <i>K.lactis</i>	52
2.2.16.6.7 Nachweis des GST-Rho1-Fusionsproteins	52
2.2.16.6.8 Nachweis des Lrg1-13myc-Fusionsproteins	53

---

3.1 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktions-Weg in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
3.1.1 Charakterisierung des Mutanten-Stammes Y1	54
3.1.1.1 Herstellung eines Tryptophan-bedürftigen Stammes	54
3.1.1.2 Rückkreuzung und Einbringen des $\Delta trp1$ -Locus in den Y1-Stamm	55
3.1.1.3 Komplementationstest verschiedener Gene in der <i>ubk1</i> -Mutanten	55
3.1.1.4 Versuch der Kartierung des mutierten <i>ubk1</i> -Gens durch Kreuzungsanalysen	56
3.1.1.5 Entwicklung eines "Screening"-Systems zur Identifizierung des <i>UBK1</i> -Gens	58
3.1.1.6 Das <i>ROM2</i> -Gen des Wildtyps komplementiert die <i>ubk1</i> -Mutante, während das <i>ROM2</i> -Gen aus verschiedenen <i>ubk1</i> -Mutanten nicht zur Komplementation fähig ist	60
3.1.1.7 Test auf Allelität des <i>ROM2</i> -Gens mit dem <i>UBK1</i> -Gen	60
3.1.1.8 Sequenzierung des mutierten <i>ROM2</i> -Gens	62
3.1.1.9 Deletion der für die PH-Domäne kodierenden Region des <i>ROM2</i> -Gens	63
3.1.2 Charakterisierung des Mutanten-Stammes Y1-1	66
3.1.2.1 Southern-Analyse zum Nachweis des Transposons im Genom des Stammes Y1-1	66
3.1.2.2 Isolierung des chromosomal integrierten Transposons mit 5'-flankierendem Bereich und Sequenzierung	67
3.1.2.3 Supprimiert ein nicht-funktionelles Lrg1-Protein die Phänotypen der <i>ubk1</i> -Mutanten?	68
3.1.2.4 Das <i>LRG1</i> -Gen und sein kodiertes Protein	70
3.1.2.5 Deletion des <i>LRG1</i> -Gens und phänotypische Analyse	71
3.1.2.6 Sporulation homozygoter $\Delta lrg1/\Delta lrg1$ -Stämme	73
3.1.2.7 Deletion von <i>LRG1</i> in verschiedenen Pkc1p-Weg-Mutanten	73
3.1.2.7.1 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta rom2$ - Mutanten	74
3.1.2.7.2 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta slg1$ - Mutanten	75
3.1.2.7.3 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta pkc1$ - Mutanten	77
3.1.2.7.4 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta bck1$ - Mutanten	78
3.1.2.7.5 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta mpk1$ - Mutanten	79
3.1.2.7.6 Deletion von <i>LRG1</i> in einer <i>rho1</i> -Mutanten	81
3.1.2.7.7 Tabellarische Zusammenfassung der Suppressionswirkung von <i>lrg1</i> -Deletionen	83
3.1.2.8 Deletion der für GTPase-aktivierende Proteine-kodierenden Gene <i>SAC7</i> , <i>BEM2</i> und <i>BAG7</i> in einer $\Delta rom2$ -Mutanten	83
3.1.2.8.1 Erzeugung von <i>sac7 rom2</i> -Doppeldeletionsmutanten	83
3.1.2.8.2 Erzeugung von <i>bem2 rom2</i> -Doppeldeletionsmutanten	85
3.1.2.8.3 Erzeugung von <i>bag7 rom2</i> -Doppeldeletionsmutanten	87
3.1.2.9 Gleichzeitige Deletionen von <i>LRG1</i> und <i>SAC7</i> zeigen einen synthetisch letalen Phänotyp	90
3.1.2.10 Funktionen von Lrg1p und Sac7p in der Zelle	91
3.1.2.10.1 Deletion von <i>LRG1</i> in verschiedenen <i>tor<sup>ts</sup></i> - Mutanten	91
3.1.2.10.2 Überexpression von <i>LRG1</i> und <i>SAC7</i>	93
3.1.2.11 Test auf Wechselwirkung von Lrg1p mit kleinen GTPasen der Rho-Familie	95
3.1.2.11.1 Test auf Interaktion von Lrg1p mit kleinen GTPasen der Rho-Familie über "Two-Hybrid"-Analyse	95
3.1.2.11.2 Test auf Interaktion von Lrg1p mit Rho1p über gemeinsame Aufreinigung	98
3.1.2.12 Messung der Pkc1p-Weg Aktivität in verschiedenen Mutanten	99
3.1.2.12.1 Immunologischer Nachweis von Mpk1p in CH1113-Derivaten	99
3.1.2.12.2 Immunologischer Nachweis von Mpk1p in MCY-22D-Derivaten	101
3.1.2.12.3 Messung der Pkc1p-Weg-Aktivität mittels einem <i>lacZ</i> -Reporter-System	103
3.1.2.13 Untersuchung der Wechselwirkung von Lrg1p mit dem zytoplasmatischen Teil der möglichen Sensoren Slg1p und Mid2p	105
3.2 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktionsweg in <i>Kluyveromyces lactis</i>	106
3.2.1 Expression von KIMpk1p in <i>K.lactis</i> und <i>S.cerevisiae</i>	106
3.2.2 Phosphorylierung von KIMpk1p in $\Delta Klbck1$ -Mutanten	107

4.1 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktions-Weg in der Hefe <i>S.cerevisiae</i>	109
4.1.1 Identifizierung von <i>UBK1</i> als <i>ROM2</i>	109

---

4.1.2 Das Lrg1-Protein als neue Komponente der Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktion in <i>S.cerevisiae</i> .....	113
4.1.2.1 Die Einordnung von Lrg1p innerhalb der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion .....	113
4.1.2.2 Die Rolle der anderen GTPase-aktivierenden Proteine Sac7p, Bem2p und Bag7p bei der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion .....	114
4.1.2.3 Lrg1p als mögliches neues GTPase-aktivierendes Protein für Rho1p .....	116
4.1.2.4 Die Domänenstruktur von Lrg1p .....	117
4.1.2.5 Die Funktion von Lrg1p und Sac7p in der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion .....	119
4.1.2.6 Mpk1-Phosphorylierung in den Mutanten und abgeleitetes Modell .....	121
4.2 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktionsweg in <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	124
4.2.1 Expression von <i>KIMPK1</i> in <i>K.lactis</i> und <i>S.cerevisiae</i> .....	124
4.2.2 Phosphorylierung von Mpk1p in $\Delta Klbck1$ -Mutanten .....	125

---

**5. ZUSAMMENFASSUNG** **127**

---

**6. LITERATURVERZEICHNIS** **128**

---

**7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS** **140**

---

**DANKSAGUNG** **142**

---

## 1. Einleitung

Eine der wichtigsten Eigenschaften von Zellen, um ihr Überleben zu sichern, ist die Fähigkeit, auf Änderungen von Umweltbedingungen reagieren zu können. Um dies zu ermöglichen, haben Zellen Signalweiterleitungskaskaden entwickelt, die eine schnelle Signalübertragung zulassen. Zu den bekanntesten Signalkaskaden zählen die Phosphoinositid-Kaskade, die Adenylatcyclase-Kaskade, das JAK-STAT-System, aber auch **MAP**-Kinase-Kaskaden (**mitogen-activated protein**). MAP-Kinase-Kaskaden sind Schlüssel-Elemente bei der Signalübertragung von der Zelloberfläche in den Kern und sind von Hefe bishin zu Säugern hoch konserviert (Widmann *et al.*, 1999). Sie setzen sich aus drei hoch-konservierten Hauptkomponenten, der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), der MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und der MAP-Kinase (MAPK), zusammen. Die MAP-Kinase (auch **ERK** = **extracellular signal-regulated kinase**) wird durch zweifache Phosphorylierung eines Threonins und eines Tyrosins von der MAP-Kinase-Kinase (auch **MEK** = **MAP** or **ERK Kinase** genannt) phosphoryliert und damit aktiviert (Ahn *et al.*, 1992). Die MAP-Kinase-Kinase wird wiederum von einer weiteren Kinase, der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MEK-Kinase oder **MEKK**) durch Phosphorylierung aktiviert.

Während bei multizellulären Organismen der interzellulären Kommunikation eine entscheidene Bedeutung zukommt, spielt bei einzelligen Organismen eher die intrazelluläre Kommunikation eine wichtige Rolle. Ein einzelliger Eukaryont, wie *Saccharomyces cerevisiae*, bietet sich daher zur Untersuchung von Signal-Kaskaden an. Neben dem Vorteil der Einzelligkeit eignet sich die Bäckerhefe auch durch eine gut etablierte Genetik und ein ausgeprägtes System der homologen Rekombination, insbesondere zur Herstellung von Deletionsmutanten, als hervorragendes Modellsystem. Ferner war *S.cerevisiae* der erste Eukaryont, dessen Genom vollständig sequenziert war (Goffeau *et al.*, 1996). In dieser Hefe finden sich sieben verschiedene MAP-Kinase-Wege (Abbildung 1.1), die die Antwort der Zellen auf Paarungspheromon ("Pheromone response"-Weg), auf hohe Osmolarität (HOG-Weg), Stickstoff- und Kohlenstoffmangel in diploiden Zellen (Sporulationsweg), Stickstoff-Mangel in haploiden Zellen (invasiver Wachstumsweg), Stickstoff-Mangel in diploiden Zellen (Pseudohyphen-Weg) und niedrige Osmolarität, Hitzestreß und Paarungspheromon (Zellintegritätsweg) regulieren (als Übersichtsartikel: siehe Levin und Errede, 1995; Banuett, 1998; Gustin *et al.*, 1998). Neuere Studien diskutieren die Existenz eines siebten MAP-Kinase-Weges, den "**SVG**"-Weg (**sterile vegetative growth**), der auch an der Erhaltung der Zellwand-Integrität in vegetativen Zellen beteiligt ist (Lee und Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000).



0,5M Natriumchlorid, 0,5M Calciumchlorid oder 0,5M Kaliumchlorid Anwendung (Torres *et al.*, 1991; Paravicini *et al.*, 1992; Levin und Bartlett-Heubusch, 1992). Auch zeigen Mutanten häufig eine veränderte Sensitivität gegen Zellwand-destabilisierende Substanzen, wie "Calcofluor White" und Kongorot (Roncero und Durán, 1985; Kopecká und Gabriel, 1992; Ram *et al.*, 1994, Lussier *et al.*, 1997). Ferner ist bei Mutanten in Komponenten, die an der Signalübertragungskaskade selbst beteiligt sind, eine erhöhte Sensitivität gegen Koffein zu beobachten (Costigan *et al.*, 1992; Martín *et al.*, 1996; Jacoby *et al.*, 1998; Kirchrath *et al.*, 2000).

Die Aufklärung der Zellwandsynthese und ihrer Regulation ist von vielseitigem Interesse. Wie bereits erwähnt, kann die MAP-Kinase-Kaskade als Modell zur Aufklärung anderer MAP-Kinase-Kaskaden aufgrund einer hohen Konservierung unter Eukaryonten dienen (Widmann *et al.*, 1999).

Da außerdem die Bildung der Zellwand untrennbar mit dem Zellwachstum verbunden ist, und die Zellwand der Pilze eine einzigartige Zusammensetzung aufweist (siehe 1.1.1.1), insbesondere im Vergleich zu Säugerzellen, bieten Enzyme zur Synthese bestimmter Zellwandbausteine ideale Angriffspunkte zur Behandlung von Pilzerkrankungen bei Säugern. Beispiele für Fungizide sind Papulacandine und Echinocandine als Inhibitoren des Glucansynthase-Komplexes (Kopecká, 1984; Castro *et al.*, 1995). Zur Hemmung der Chitin-Synthasen finden Nikkomycine ihre Anwendung (El-Sherbeini und Clemas, 1995). So läßt die Erforschung der Regulationsmechanismen der Zellwand-Biosynthese die Entwicklung weiterer, neuer Antimykotika erwarten.

Neben der Entwicklung von Antimykotika ist die Erforschung der Regulation der Zellwandbiosynthese auch von biotechnologischem Interesse. Erstmals wurde eine biotechnologische Anwendung autolytischer Stämme von Stateva *et al.* (1988) beschrieben. Auch Alvarez *et al.* (1994) entwickelten ein System, bei dem ein Protease-defizienter Stamm mit einem Defekt im *MPK1*-Gen (vgl. Abschnitt 1.1.1.3) kombiniert wurde. Eine biotechnologische Anwendung dieses Systems liegt in der Lyse der Zellen durch Temperaturerhöhung, was zur Freisetzung heterolog exprimierten Proteins ins Medium führt. Zhang *et al.* (1999) nutzten die regulierte Expression des *SRBI*- und des *PKCI*-Gens (vgl. Abschnitt 1.1.1.2) unter Kontrolle des *MET3*-Promotors, um durch Abschalten der Gene eine Lyse der Zellen zu induzieren. Durch diese Systeme entfällt der Schritt des Zellaufschlusses bei der biotechnologischen Produktion heterologer Proteine in Hefe.

Aufgrund eines vielseitigen Interesses an der Aufklärung des Aufbaus der Zellwand und des dafür verantwortlichen Regulationssystems finden weltweite Bemühungen statt, diesem Ziel näher zu kommen.

### 1.1.1.1 Der Aufbau der Zellwand

Die Zellwand von *S.cerevisiae* ist eine feste Struktur, die der Zelle Schutz, Form und Festigkeit verleiht, gleichzeitig aber auch dynamisch in ihrer Zusammensetzung sein muß, um Formveränderungen während des Zellzyklus oder sich ändernder Wachstumsbedingungen zuzulassen (Cabib *et al.*, 1988; Klis, 1994; Cid *et al.*, 1995; Cabib *et al.*, 1997; Lipke und Ovale, 1998; Smits *et al.*, 1999). Sie macht 20-30% des Trockengewichtes der ganzen Zelle aus und bildet damit eine Hauptsubstanz, für deren Erhalt die Zelle Energie aufbringen muß (Klis, 1994).

Die Synthese der Zellwand hängt sowohl von der Funktionalität der biosynthetischen Enzyme ab, als auch von einem intakten Aktinzytoskelett, das die Sekretionsmaschinerie zum Ort der Neusynthese polarisiert (Mulholland *et al.*, 1994; Gabriel und Kopecká, 1995). Die Zellwand ist in zwei Schichten aufgebaut, die aus nur vier verschiedenen Makromolekülen bestehen,  $\beta$ -1,3-Glucan,  $\beta$ -1,6-Glucan, Mannoproteine und Chitin (siehe Abbildung 1.2).

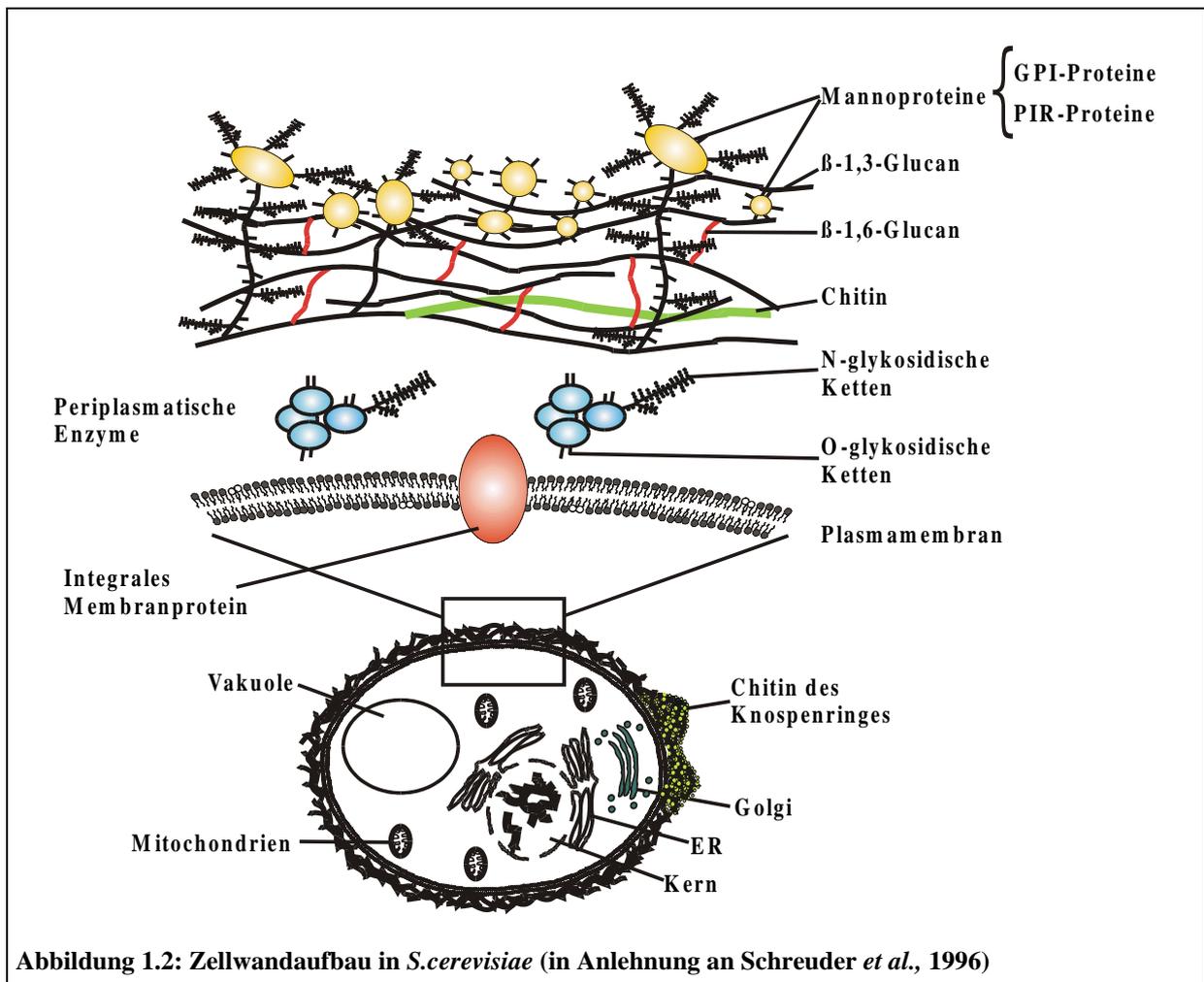


Abbildung 1.2: Zellwandaufbau in *S.cerevisiae* (in Anlehnung an Schreuder *et al.*, 1996)

Diese Komponenten sind wiederum miteinander über kovalente Bindungen vernetzt. Mit mehr als 50% Trockengewichtsanteil macht die Hauptstrukturkomponente das  $\beta$ -1,3-Glucan aus (Klis, 1994; Kapteyn *et al.*, 1999). Dieses verleiht der Zellwand ihre Form, Stärke und Festigkeit (Klis, 1994). Es handelt sich meist um lineare Ketten, die aus bis zu 1500 Molekülen Glucose bestehen und miteinander über  $\beta$ -1,3-Bindungen verknüpft sind. Diese linearen Moleküle sind selten durch Ketten aus 40-50  $\beta$ -1,6-verknüpften Glucose-Resten quervernetzt. So haben diese Ketten nicht-reduzierende Enden, die sowohl als Akzeptor für  $\beta$ -1,6-Glucan, als auch für Chitin, dienen können. Das  $\beta$ -1,6-Glucan ist stark quervernetzt, sowohl durch  $\beta$ -1,3- als auch durch  $\beta$ -1,6-verknüpfte Seitenketten (Klis, 1994). Es besteht aus 140 Glucose-Resten und trägt zu etwa 5% zur Zellwandtrockenmasse bei (Kapteyn *et al.*, 1999). Mit diesen Hauptkomponenten sind auch Zellwand- oder Mannoproteine (**CWPs** = "**c**ell **w**all **p**roteins") kovalent verknüpft (Kapteyn *et al.*, 1999). Die CWPs bilden radiale Fibrillen an der Außenseite der Zellwand und tragen zu etwa 30-50% zum Trockengewicht der Zellwand bei. Bisher ließen sich zwei Klassen von Zellwandproteinen identifizieren: i) Die **GPI**-Proteine ("**G**lycosyl**p**hosphatidyl**i**nositol") und ii) die **PIR**-Proteine ("**p**roteins with **i**nternal **r**epeats"). GPI-Proteine sind hochglykosylierte Serin- und Threonin-reiche Moleküle, die eine N-terminale Signalsequenz enthalten, und eine hydrophobe Sequenz am C-Terminus, die beim Durchlauf des Sekretionsweges durch einen "GPI-Anker" ersetzt wird. Die PIR-Proteine enthalten ein N-terminales Signalpeptid, eine Kex1p-Erkennungsstelle und eine bis mehrere interne Wiederholungssequenzen und sind ebenfalls hochglykosyliert. Sie enthalten jedoch keinen GPI-Anker und sind ohne eine Brücke aus  $\beta$ -1,6-Glucan kovalent mit dem  $\beta$ -1,3-Glucan verbunden. Der Chitin-Gehalt der Zellwand trägt nur zu etwa 1-2% zum Trockengewicht der Zellwand bei. Dabei finden sich lineare Ketten von etwa 120 Einheiten

N-Acetylglucosamin vorwiegend am Ring der Knospe, aber auch in den lateralen Wänden in der Nähe der Plasmamembran (Abbildung 1.2; Bulawa, 1993).

Für die Synthese der einzelnen Komponenten ist eine Vielzahl von Enzymen nötig. Die  $\beta$ -1,3-Glucanketten werden vom Plasmamembran-gebundenen Glucansynthase-Komplex, der sich aus zwei alternativen katalytischen Untereinheiten, **Fks1p** und **Fks2p** (**FK506-sensitive**), zusammensetzen kann, ins Periplasma synthetisiert. Während Fks1p sowohl Zellzyklus-reguliert ist, als auch unter optimalen Wachstumsbedingungen vorherrscht, wird Fks2p bei Wachstum auf schlechten Kohlenstoffquellen, beim Fehlen von Fks1p, aber auch bei Anwesenheit von Pheromon oder hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in Abhängigkeit von Calcineurin oder bei der Sporulation gebildet (Mazur *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1995; Garrett-Engele *et al.*, 1995). Die Aktivität der katalytischen Untereinheiten wird von einem GTP-bindenden Protein reguliert (Mol *et al.*, 1994), von dem andere Gruppen zeigen konnten, daß es sich dabei um die kleine GTPase Rho1p handelt (Drgonová *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996), die auch als Aktivator der Proteinkinase C agiert (Kamada *et al.*, 1996; Nonaka *et al.*, 1995; siehe Abschnitt 1.1.1.4)

Die Chitinsynthese erfolgt an den Plasmamembran-gebundenen Enzymen Chs1p, Chs2p und Chs3p (Bulawa, 1993), wobei diese Proteine sich in ihren Funktionen innerhalb des Zellzyklus unterscheiden. Obwohl die Zellwand im Vergleich zu den anderen Komponenten wenig Chitin enthält, ist dieses jedoch sehr wichtig. Dies zeigt sich insbesondere dadurch, daß *chs2 chs3*-Doppelmutanten nicht lebensfähig sind (Shaw *et al.*, 1991; Cid *et al.*, 1995). Die Chitin-Synthasen sind auch von Interesse, da Zellen als Antwort auf Zellwanddefekte einige kompensatorische Mechanismen entwickelt haben, wie z.B. eine Erhöhung der Chitin- und Mannan-Synthese (Popolo *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1998) und einen Anstieg der Kopplung von Mannan über  $\beta$ -1,6-Glucan an Chitin (Kapteyn *et al.*, 1997).

Auch die Proteinzusammensetzung der Zellwand variiert in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen und Zellzyklus (DeRisi *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 1998; Spellman *et al.*, 1998; Caro *et al.*, 1998; Smits *et al.*, 1999). Beispiele hierfür sind z.B. das Egt2-Protein, das nur während eines kurzen Zeitraums zwischen dem Ende der Mitose und dem Beginn der G1-Phase gebildet wird. Dabei geht man davon aus, daß Egt2p an der Zelltrennung von Mutter- und Tochterzelle nach der Zytokinese beteiligt ist (Kovacech *et al.*, 1996). Neben der Zellzyklus-induzierten Expression von Komponenten gibt es noch die Expression, die durch Faktoren der Umgebung, wie Temperatur, Sauerstoffgehalt, Kohlenstoffquelle, Osmolarität und Paarungspheromon induziert wird. So werden z.B. die Adhäsionsmoleküle Aga1p und Ag $\alpha$ 1p durch Pheromon (Lipke und Kurjan, 1992), Tir1p durch anaerobe Bedingungen und Kälte (Donzeau *et al.*, 1996; Kitagaki *et al.*, 1997; Kowalski *et al.*, 1995) und Tip1p bei niedriger und hoher Temperatur und anaeroben Bedingungen induziert (Kondo und Inouye, 1991; Muñoz-Dorado *et al.*, 1994; Donzeau *et al.*, 1996). Die Proteine Tir1p und Tip1p sind Mitglieder der Seripauperin-Familie möglicher Zellwandmannoproteine (Viswanathan *et al.*, 1994).

Neben den biosynthetisch aktiven Enzymen existieren in Hefe eine Vielzahl von degradierenden Enzymen, auch Autolysine genannt, wie  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glucanasen und Chitinasen. Auch diese müssen streng kontrolliert sein, um eine Lyse der Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen, insbesondere aber auch in der stationären Phase, zu verhindern (Nombela *et al.*, 1988).

Um zu gewährleisten, daß die Zellwand zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus und bei jeder Wachstumsbedingung die richtige Zusammensetzung aufweist, bedarf es eines komplexen Regulationssystems. So sollte bei vegetativem Wachstum eine örtliche und zeitliche Regulation der Zellwandsynthese erfolgen, damit sich zum einen das Zellwandwachstum auf die wachsende Tochterzelle beschränkt. Zum anderen muß die Zellwandsynthese in Koordination mit dem Zellzyklus ablaufen (Cabib *et al.*, 1997).

Dieses komplexe Regulationssystem wird nach bisherigen Erkenntnissen durch den Proteinkinase C-vermittelten MAP-Kinase-Weg übernommen, nach neueren Erkenntnissen auch teilweise vom "SVG"-Weg (Lee und Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000).

### 1.1.1.2 Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C ist eine Serin/Threonin-spezifische Kinase, die durch Phosphorylierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase Bck1p (Watanabe *et al.*, 1994; Levin *et al.*, 1994) die MAP-Kinase-Kaskade in Gang setzt (siehe 1.1.1.3). Pkc1p ist das einzige homologe Protein zur Proteinkinase C aus Säugern in Hefe. In Säugern existiert eine Vielzahl von verschiedenen Pkc-Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\eta$ , PRK's), die sich aufgrund von Strukturmerkmalen in verschiedene Unterfamilien ordnen lassen. Dabei handelt es sich um die "klassischen" Proteinkinase C-Typen (cPKC), die "neuen" Proteinkinase C-Typen (nPKC), die "atypischen" Proteinkinase C-Typen (aPKC) und die Proteinkinase C-verwandten Kinasen (**PRK's**= "**P**roteinkinase C-**r**elated **k**inase") (Mellor und Parker, 1998). Die Proteinkinase C der Hefe läßt sich keiner dieser Gruppen eindeutig zuordnen, da sie einige Strukturmerkmale mit den atypischen Proteinkinase C-Mitgliedern als auch mit den Proteinkinase C-verwandten Kinasen teilt (Mellor und Parker, 1998). Mutanten in dem für das Pkc1p kodierenden Gen können jedoch durch die Pkc- $\eta$  und die Pkc- $\delta$  des Menschen komplementiert werden, die in die Gruppe der "neuen" Pkc-Subtypen fallen (Nomoto *et al.*, 1997). Die ersten biochemischen Daten deuteten an, daß die Hefe-Pkc weder durch Calcium, Diacylglycerol (DAG), Phorbolster, Phosphatidylserin, Phosphatidylinositol noch durch Arachidonsäure aktiviert werden kann (Antonsson *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994). Jedoch konnten Kamada *et al.* (1996) zeigen, daß erst die Anwesenheit des GTP-gebundenen Proteins Rho1p eine Aktivierung von Pkc1p durch Phosphatidylserin ermöglicht. Die Substrat-Spezifität von Pkc1p ist dagegen ähnlich der der Säuger-Pkc- $\delta$  und Pkc- $\epsilon$ , die durch die genannten Effektoren, außer Calcium, aktivierbar sind (Antonsson *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994). Obwohl bisher keine Aktivierung der Proteinkinase C aus Hefe durch DAG gezeigt werden konnte, zeigen Mutanten mit einer veränderten C1-Domäne, der möglichen Bindestelle für DAG phänotypische Effekte, wie eine erhöhte Sensitivität gegen Koffein und "Calcofluor White" (Jacoby *et al.*, 1997). Gleichzeitig scheint diese Stelle aber auch der Ort der Bindung für die kleine GTPase Rho1p zu sein (Kamada *et al.*, 1996; siehe auch Abschnitt 1.1.1.4).

Das *PKC1*-Gen wurde zuerst von Levin *et al.* (1990) isoliert. Die Deletion dieses Gens erwies sich zunächst als letal. Mutanten zeigten einen Zellzyklus-spezifischen Arrest, der sich durch das Auftreten von Zellen mit kleiner Knospe, ungeteiltem Kern, aber verdoppelter DNA sichtbar machte. In anderen Studien konnten durch osmotische Stabilisierung lebensfähige Deletionsmutanten erzeugt werden (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini *et al.*, 1992). Die Lyse der Zellen wird durch eine dünnere Zellwand verursacht, die nur 60% Dicke der Wildtyp-Zellwand aufweist, was sowohl auf einen verminderten  $\beta$ -Glucan-Gehalt als auch eine dünnere Mannoproteinschicht zurückzuführen ist (Levin *et al.*, 1994; Roemer *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994). Ferner finden sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen Löcher an den Spitzen der Knospen der Tochterzellen (Levin *et al.*, 1994).

*PKC1* hat einige Synonyme bedingt durch dessen Identifizierung in vielen verschiedenen "Screens". So ist es auch als *STT1* (**s**t<sub>1</sub>**t**ausporine- and **t**emperature-sensitive; Yoshida *et al.*, 1992), *CLY15* (**c**ell **l**ysis; Paravicini *et al.*, 1992), *HPO2* (**h**ypo-**o**smolarity-sensitive, Shimizu *et al.*, 1994) und *RSF8* (**r**equiring **s**wi **f**our; Igual *et al.*, 1996) bekannt.

Die Lokalisierung von Pkc1p in Hefe variiert sowohl zeitlich als auch räumlich über den Zellzyklus (Andrews und Stark, 2000). So kolokalisiert Pkc1p Rho1p-abhängig an Stellen von kortikalen Aktinansammlungen. Pkc1p findet sich an der Stelle, wo die zukünftige Knospe erscheinen soll, und nach deren Bildung an der Knospenspitze und am Knospenhals zwischen Mutter- und Tochterzelle während der Zytokinese. Diese Lokalisierungen, mit Ausnahme der am Knospenhals, sind von einem intakten Aktinzytoskelett abhängig. Da in

diesen Zellzyklusstadien auch die Lokalisierung von Rho1p Aktin-abhängig ist, könnten diese Effekte eher sekundär sein. Neben der über den Zellzyklus variierenden Lokalisierung von Pkc1p erfolgt auch nach dem Auftreten von Zellwandschäden eine Relokalisierung von Pkc1p von den Stellen polarisierten Wachstums zu den entsprechenden Stellen der Zellwand, möglicherweise um dort entstandene Schäden für eine nötige Reparatur zu markieren (Andrews und Stark, 2000).

Da der Phänotyp von  $\Delta pkc1$ -Mutanten im Vergleich zu Mutanten des MAP-Kinase Moduls wesentlich stärker ist, wird schon seit langem ein weiterer Weg, der parallel zur MAP-Kinase-Kaskade agiert und ebenfalls von der Proteinkinase C reguliert wird, diskutiert. Zum einen wurden  $pkc1$ -Mutanten bei der Suche nach Mutanten mit erhöhter mitotischer Rekombination gefunden, die mit steigender Temperatur noch zunimmt und nicht durch osmotische Stabilisierung verhindert werden kann (Huang und Symington, 1994). Dieser "Hyperrekombinations-Phänotyp" ist Rad52p-abhängig und zeigt sich nicht bei  $mpk1$ -Mutanten. So könnte es sich bei dieser Funktion um eine für Pkc1p spezifische Funktion handeln.

Desweiteren scheint Pkc1p die Zellfusion bei der Paarung zu hemmen, wenn intra- und extrazelluläre Osmolaritäten voneinander abweichen (Philips und Herskowitz, 1997). Neuere Studien zeigten, daß Pkc1p nicht nur für die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade nötig ist, sondern auch für die Repression von rDNA-Genen und Genen für ribosomale Proteine bei der Antwort auf Sekretionsdefekte (Nierras und Warner, 1999; Li *et al.*, 2000).

Neben der Regulation der Ribosomen-Biogenese gibt es auch Hinweise auf eine Regulation der Oligosaccharyltransferase durch Pkc1p (Park und Lennarz, 2000). Die Autoren beschrieben Fragmente der Proteinkinase C (Aminosäure 161-727), denen die Kinase-Domäne fehlt, als Interaktionspartner der Oligosaccharyltransferasen-Untereinheiten Swp1p, Stt3p und Wbp1p im "Two-Hybrid"-System. Ferner konnten sie auch eine Interaktion *in vitro* zwischen Pkc1p und drei Untereinheiten des Oligosaccharyl-Komplexes, Swp1p, Wbp1p und Ost1p zeigen. Gleichzeitig geht die Deletion von *PKC1* mit einer verminderten Oligosaccharyltransferase-Aktivität einher (Park und Lennarz, 2000).

### 1.1.1.3 Das MAP-Kinase-Modul des Weges

Das MAP-Kinase-Modul besteht aus der MAP-Kinase-Kinase-Kinase Bck1p (Slk1p), den zwei redundanten MAP-Kinase-Kinasen Mkk1p und Mkk2p und der MAP-Kinase Mpk1p (Slk2p) (Banuett, 1998; Gustin *et al.*, 1998; Heinisch *et al.*, 1999; Abbildung 1.1 und 1.3).

*BCK1* wurde zuerst von (Irie *et al.*, 1991a) als SSP31 (suppressor of the smp3-1 mutation) als Suppressor einer Temperatur-sensitiven *sm*p3-Mutanten isoliert. Bei SMP3 (stable maintenance of pSR1) handelt es sich um ein essentielles Gen. Konditionale Mutanten dieses Gens wurden bei der Suche nach Mutanten isoliert, die heterologe Plasmide stabiler als der Wildtyp an Tochterzellen weitergeben (Irie *et al.*, 1991b)

Hinweise auf eine Beteiligung des Bck1-Proteins (bypass of C kinase) an der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion lieferten Lee und Levin (1992). Sie isolierten dominant-aktive Allele des *BCK1*-Gens als Suppressoren der Letalität einer  $\Delta pkc1$ -Mutanten. Die Deletion des *BCK1*-Gens führt zu einer Zelllyse bei 37°C (Lee und Levin, 1992). In einem anderen genetischen Ansatz entdeckten Costigan *et al.* (1992), daß *bck1*-Mutanten ein funktionelles SPA2-Gen (spindle pole antigen) für ihr vegetatives Wachstum benötigen. Sind beide Gene defekt (*spa2 bck1*), verlieren die Zellen ihre Lebensfähigkeit. Man spricht in einem solchen Fall auch von synthetischer Letalität. Daher bezeichneten die Autoren das *BCK1*-Gen als SLK1 (synthetic lethal kinase). Nähere Analysen der  $\Delta bck1$ -Mutanten zeigten auch im Vergleich zum Wildtyp verkürzte Paarungsprojektionen ("Smooths"; Costigan *et al.*, 1992). Ferner sind homozygote, diploide Mutanten nicht mehr in der Lage zu sporulieren, während haploide Mutanten keinen G1-Arrest mehr einleiten können, sondern auch bei

Nährstofflimitierung den Zellzyklus weiterdurchlaufen. Sie akkumulieren nicht mehr den Reservestoff Glykogen und verlieren ihre Lebensfähigkeit nach Hungerperioden oder Hitzeschock (Costigan *et al.*, 1992). Während die Zellyse von  $\Delta bck1$ -Mutanten durch Zugabe osmotischer Stabilisatoren verhindert werden kann, kann die korrekte Antwort der Mutanten auf Hunger damit nicht vermittelt werden (Costigan und Snyder, 1994). So kommen dem Bck1-Protein wohl zwei Funktionen zu: Eine für die Aufrechterhaltung der Zellwand und eine andere, um sich an das Nährstoffangebot anzupassen. Die Überexpression des N-terminalen Teils des Bck1-Proteins führt im Wildtyp zu erhöhter Hungersensitivität, die möglicherweise durch Wechselwirkung des verkürzten Proteins mit dem Wildtyp-Protein zustande kommt (Costigan und Snyder, 1994). So wurde für den N-terminalen Teil eine autoinhibitorische Funktion postuliert.

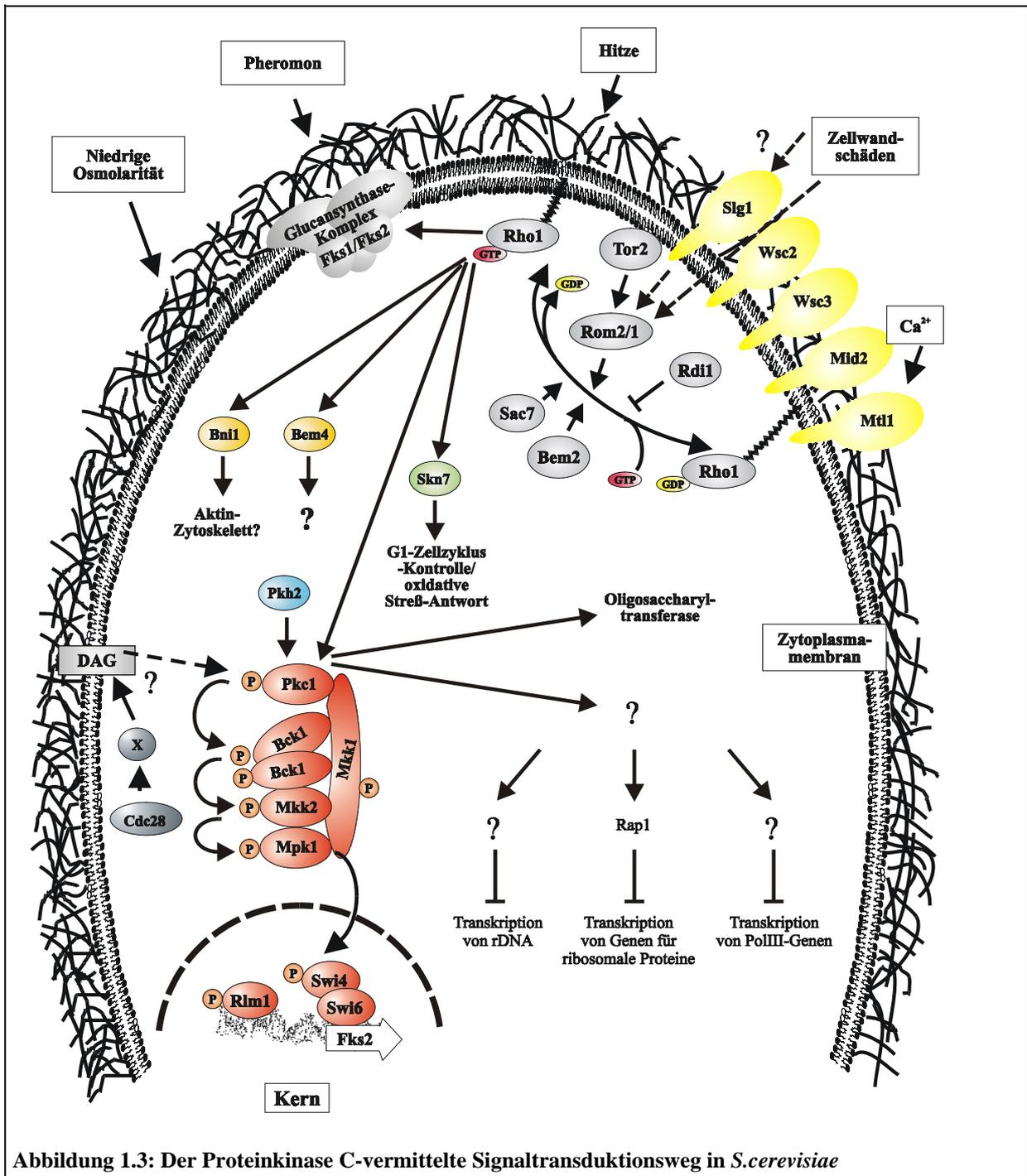


Abbildung 1.3: Der Proteinkinase C-vermittelte Signaltransduktionsweg in *S. cerevisiae*

**MKK1** (**M**AP **k**inase **k**inase) wurde als Hochkopienzahl-Suppressor der schon erwähnten *smp3-1*-Mutanten isoliert (Irie *et al.*, 1993). Durch nicht-stringente Southern-Analyse konnte ein zweites homologes Gen, **MKK2**, identifiziert werden. Während die Deletion der einzelnen Gene zu keinem sichtbaren Phänotyp führt, verursacht die gleichzeitige Deletion von **MKK1** und **MKK2** den für Pkc1p-Weg-Mutanten typischen Zelllyse-Defekt (Irie *et al.*, 1993). Mkk1p und Mkk2p sind dual-spezifische Kinasen, die das Mpk1-Protein phosphorylieren (Martín *et al.*, 2000).

Das für die MAP-Kinase des Weges kodierende Gen **MPK1** (**M**AP **k**inase) wurde von Torres *et al.* (1991) als **SLT2**-Gen (**s**uppressor of **l**yt2) als Suppressor einer autolysierenden, thermosensitiven *lyt2*-Mutanten isoliert. Es war auch das erste für eine Kinase kodierende Gen, für das eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung der Zellwand postuliert werden konnte. Die Deletion von **MPK1** resultiert in einem Stamm, der bei höherer Temperatur (37°C) lysiert, dessen Lyse aber durch die Zugabe von Sorbit verhindert werden kann. Lee *et al.* (1993) isolierten das **MPK1**-Gen nochmals als Hochkopienzahl-Suppressor des Zelllyse-Defektes einer  $\Delta bck1$ -Mutanten. Aufgrund von Homologie-Vergleichen schlossen sie, daß es sich hierbei um eine Serin/Threonin-spezifische MAP-Kinase handeln mußte. Verschiedene Untersuchungen legten nahe, daß Mpk1p selbst an einem Threonin-Rest an Position 190 und an einem Tyrosin-Restes an Position 192 phosphoryliert wird (Davenport *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1993; Martín *et al.*, 2000).

Die Phosphorylierung beginnt bereits 15 Sekunden nach Gabe eines äußeren Reizes und hält über 15 Minuten an (Zarrov *et al.*, 1996) Solche Reize sind z.B. milder Hitzeschock (30 Minuten bei 39°C) oder Zug auf die Plasmamembran, hervorgerufen durch Agenzien wie Chlorpromazine (Kamada *et al.*, 1995). Mpk1p wird auch in Phasen polarisiertem Wachstums aktiviert. Darunter fallen zum einen Phasen des Zellzyklus, wie nach dem Durchlaufen von START beim Einsatz der Knospenbildung und ihres Wachstums, aber auch bei Bildung von Paarungsprojektionen ("Smoothes") nach Behandlung mit Pheromon (Zarrov *et al.*, 1996). Mizunuma *et al.* (1998) entdeckten sogar eine Aktivierung von Mpk1p durch extrazelluläre Calcium-Ionen.

Aufgrund von Epistasie-Analysen, aber auch durch Homologievergleiche mit bereits bekannten konservierten MAP-Kinase-Kaskaden, entstand die in Abbildung 1.3 gezeigte Reihenfolge der aufeinanderfolgenden Kinasen (Errede und Levin, 1993; Lee *et al.*, 1993). Diese konnte noch weiter durch "Two-Hybrid"-Analysen und *in-vitro*-Bindungsstudien bestätigt werden (Soler *et al.*, 1995). Dabei zeigte sich, daß die N-terminalen regulatorischen Domänen von Mkk1p und Mkk2p für die Interaktion mit Mpk1p benötigt werden (Soler *et al.*, 1995).

Aufgrund von "Two-Hybrid"-Analysen ließen sich auch weitere Wechselwirkungen zwischen den Komponenten der MAP-Kinase-Kaskade und Pkc1p ableiten. Bei der Suche nach Interaktionspartnern von Pkc1p isolierten Paravicini und Friedli (1996) Teile von Mkk1p. Sie konnten zeigen, daß die Interaktion von Pkc1p auch mit einer katalytisch inaktiven Variante von Mkk1p stattfindet, und dafür die Interaktion mit Bck1p nicht nötig ist. Es konnte jedoch keine Wechselwirkung zwischen Pkc1p und Mkk2p, Bck1p oder Mpk1p gezeigt werden. Dagegen zeigte sich eine Interaktion von Mkk2p mit Mpk1p und von Bck1p mit Mkk1p und Mkk2p. (Soler *et al.*, 1995; Paravicini und Friedli, 1996) Ebenso zeigte Bck1p eine intermolekulare Interaktion mit sich selbst. Bck1p liegt somit wahrscheinlich als Dimer in der Zelle vor. Die in Abbildung 1.3 gezeigte Darstellung leitet sich von diesen Ergebnissen ab.

#### 1.1.1.4 Sensoren und Aktivatoren des Weges

Da die Aktivierung des Zellintegritätsweges nach bisherigen Erkenntnissen über eine Aktivierung der Proteinkinase C läuft, sind hier vor allem deren Aktivatoren zu nennen. Zum einen konnte eine Aktivierung durch die Proteinkinase Pkh2p gezeigt werden (Inagaki *et al.*,

1999). Pkh2p ist zum Säuger-**PDK1**-Protein (3-**phosphoinositide-dependent kinase**) homolog (Casamayor *et al.*, 1999) und es phosphoryliert *in vitro* einen Threonin-Rest an Position 983 in Pkc1p (Inagaki *et al.*, 1999). In Hefe finden sich noch zwei weitere homologe Proteine, Pkh1p und Pkh3p. Für diese konnte jedoch keine direkte Aktivierung von Pkc1p gezeigt werden (Inagaki *et al.*, 1999).

Einen anderen Aktivator stellt das GTP-bindende Protein **Rho1p** (**Ras homologous**) dar (Nonaka *et al.*, 1995). Es bindet in seiner GTP-gebundenen Form Pkc1p und aktiviert dieses damit (Kamada *et al.*, 1996). Das **RHO1**-Gen ist essentiell (Madaule *et al.*, 1987) und seine Überexpression führt zu einem Wachstumsstopp der Zellen (Espinet *et al.*, 1995). Sein kodiertes Protein wird isoprenyliert (Ohya *et al.*, 1993) und diese Modifikation ist für seine Aktivität als regulatorische Untereinheit des Glucansynthase-Komplexes *in vitro* erforderlich (Inoue *et al.*, 1999).

Rho1p kann sowohl in einer GTP-gebundenen, aktiven, als auch in einer GDP-gebundenen, inaktiven Form vorliegen. Da alle bisher bekannten Funktionen durch das in der GTP-gebundenen Form vorliegende Rho1p übernommen werden (siehe unten), nimmt die Regulation des Austauschs von GDP zu GTP ebenso wie die Regulation der Hydrolyse des von Rho1p-gebundenen GTPs einen zentralen Kontrollpunkt ein. Das Gleichgewicht zwischen der GTP- und der GDP-Form wird deshalb von zahlreichen Proteinen beeinflusst (Cabib *et al.*, 1998). Zum einen fördern die beiden GDP/GTP-Austauschfaktoren (**GEF** = **GDP/GTP exchange factor**) Rom1p und Rom2p (**ROM** = **RHO1 multicopy suppressor**) den Austausch von GDP zu GTP. Ein Teil des kodierenden Bereichs des **ROM1**-Gens wurde von Ozaki *et al.* (1996) als Hochkopienzahl-Suppressor einer Temperatur-sensitiven, dominant-negativen *rho1*-Mutanten isoliert. Bei einem anschließenden Homologie-Vergleich mit der Datendank entdeckten die Autoren das **ROM2**-Gen. Die Deletion der einzelnen Gene führt zu Temperatur-sensitivem Wachstum der Mutanten (Ozaki *et al.*, 1996), während die gleichzeitige Deletion beider Gene letal ist. Doppelmutanten können jedoch durch Zugabe von 1M Sorbit gerettet werden. **ROM2** konnte auch von Manning *et al.* (1997) als Hochkopienzahl-Suppressor einer *cik1*-Deletion isoliert werden. Cik1p ist eine Komponente des Spindelpolkkörpers und nötig für den Aufbau und/oder den Erhalt des Spindelapparats (Page und Snyder, 1992) und deutet eine Verbindung zwischen der Aufrechterhaltung der Zellintegrität und der Regulation des Mikrotubuli-Zytoskeletts an. Rom2p lokalisiert wie Rho1p und Pkc1p an Orten in der Zelle, an denen polarisiertes Wachstum stattfindet, wie z.B. an den zukünftigen Knospungsstellen, an den Spitzen sehr kleiner Knospen und an den "Smooths" (Manning *et al.*, 1997). Ein weiterer GDP/GTP-Austauschfaktor wird von **TUS1** (**Tor2p unique function suppressor**) kodiert (T. Schmelzle und M. Hall, persönliche Mitteilung).

Der Austausch von GDP zu GTP durch Rom2p kann durch das **Rdi1**-Protein (**Rho-GDP-dissociation inhibitor**) verhindert werden, das an das Lipid-modifizierte, GDP-gebundene Rho1p bindet (Ozaki *et al.*, 1996). Die Überexpression von **RDII** führt zu einem Wachstumsarrest (Masuda *et al.*, 1994). Neben seiner Bindung an das GDP-gebundene Rho1p wirkt es auch auf das inaktive Cdc42p (Koch *et al.*, 1997), eine weitere kleine GTPase der Rho-Familie in Hefe. Dies ist nicht verwunderlich, da **RDII** das bisher einzige, für einen Rho-GDP-Dissoziationsinhibitor kodierende Gen ist, das in *S.cerevisiae* identifiziert wurde. Da Rdi1p zytosolisch lokalisiert ist (Koch *et al.*, 1997), geht man davon aus, daß es durch Bindung an das GDP-gebundene, Lipid-modifizierte Rho1p bzw. Cdc42p diese Proteine im Zytosol in ihrer inaktiven Form hält, bis ein weiterer Faktor den Austausch des GDP gegen GTP durch Rom2p erlaubt und Rho1p an die Plasmamembran lokalisiert.

Die intrinsische GTPase-Aktivität von Rho1p gegenüber seinem gebundenen GTP kann durch sogenannte GTPase-aktivierende Proteine (**GAP** = **GTPase activating protein**) verstärkt werden. Für Rho1p wurden bisher zwei GTPase-aktivierende Proteine identifiziert: **Sac7p** [**suppressor of actin**] (Schmidt *et al.*, 1997) und **Bem2p** [**bud emergence**] (Peterson *et al.*,

1994). Bei einem dritten Protein, Bag7p, wird diese Funktion für Rho1p vermutet (Schmidt und Hall, 1998).

Über die Regulation der Rho1p-regulierenden Proteine selbst ist wenig bekannt. Der GDP/GTP-Austauschfaktor Rom2p wird zum einen über einen noch nicht näher charakterisierten Mechanismus von Tor2p aktiviert (Schmidt *et al.*, 1997). Das **Tor2**-Protein (**t**arget **o**f **r**apamycin) vereinigt zwei Funktionen in sich. Es übt eine Tor2p-spezifische Funktion aus, die für die Zellzyklus-abhängige Regulation des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich ist. Diese Regulation erreicht Tor2p über eine Aktivierung der Proteine Rho1p, Pkc1p und Komponenten der MAP-Kinase-Kaskade (Helliwell *et al.*, 1998b). Die zweite Funktion, die es sich mit seinem Homologen Tor1p teilt, ist verantwortlich für die Aktivierung der Translationsinitiation und gewährleistet den Zellen damit ein Fortschreiten in der G1-Phase (Helliwell *et al.*, 1998a; Barbet *et al.*, 1996). Diese Funktion steht in keinem Zusammenhang mit dem Pkc1p-Weg.

Ein alternativer Aktivierungsmechanismus von Rom2p erfolgt Tor2p-unabhängig und wird durch Zellwanddefekte ausgelöst (Bickle *et al.*, 1998)

Bei der durch Zellwandschäden hervorgerufenen Aktivierung könnte den in der Plasmamembran lokalisierten Sensoren Wsc1p, Wsc2p, Wsc3p, Mid2p und Mtl2p eine entscheidende Funktion zukommen. Nach dem z.Zt. gültigen Modell nehmen sie Signale, wie Schäden in der Zellwand, Stress oder die Osmolarität des Mediums wahr und geben dann weiteren Komponenten ein Signal, das letztendlich zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade führt. Nach neuesten Erkenntnissen scheint es, als wird der Zellwandschaden durch Wsc1p wahrgenommen, um dann über eine direkte Interaktion mit Rom2p dieses zu aktivieren (Delley und Hall, 1999; M. Hall, persönliche Mitteilung).

Das Protein **Slg1p** (**s**ynthetic **l**ethal with **G**AP) [**Wsc1p** (cell **w**all integrity and **s**tress response **c**omponent), **Hcs77p** (**h**igh **c**opy **s**uppressor)] wurde gleichzeitig von drei Arbeitsgruppen als möglicher Sensor des Weges identifiziert (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998).

Während Gray *et al.* (1997) das *SLG1*-Gen als *HCS77* als Dosis-abhängigen Suppressor des Knospungdefektes einer *swi4*-Mutanten identifizierten, isolierten Jacoby *et al.* (1998) eine *slg1*-Muante bei der Suche nach Mutanten mit Defekten in Komponenten oberhalb der MAP-Kinase-Kinase-Kinase Bck1p. Verna *et al.* (1997) isolierten nicht nur *SLG1* als *WSC1* als Suppressor der Hitzeschock-Sensitivität einer *ira1*-Mutanten, sondern auch noch das homologe Gen *WSC2*. Durch Homologievergleich mit einer Datenbank konnten sie noch ein drittes Homologes identifizieren, das *WSC3*-Gen. Diese ließen sich aufgrund ihrer Strukturmerkmale in eine neue Familie von Genen ordnen.

Ein weiterer möglicher Sensor wird kodiert von dem *MID2*-Gen. Erste Hinweise auf eine Beteiligung von Mid2p an der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion stammten aus einer Arbeit von Jacoby (1997), der dieses Gen als schwachen Suppressor einer bis zum Beginn dieser Arbeit nicht identifizierten Mutanten isolierte. Auch durch andere Gruppen wurde eine Beteiligung des Mid2-Proteins an der Aufrechterhaltung der Zellintegrität gezeigt (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Während Rajavel *et al.* (1999) *MID2* als Suppressor in niedriger Kopienzahl des Zelllyse-Defektes einer  $\Delta$ *slg1*-Deletionsmutanten bei 39°C isolierten, identifizierten Ketela *et al.* (1999) dieses Gen als Aktivator des Transkriptionsfaktor Skn7p in hoher Kopienzahl. Beide Gruppen identifizierten durch Homologie-Vergleich ein Mid2p-homologes Protein, das **Mtl1p** (**M**id **t**wo-**l**ike). Die Deletion dieses Gens führt jedoch zu keinem Phänotyp. Deletiert man jedoch *MID2* und *MTL1*, zeigen die Zellen einen Zelllyse-Defekt bei 39°C, der durch 1 M Sorbit supprimiert werden kann (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999).

Hinweise auf überlappende Funktionen von Slg1p und Mid2p stammen aus einer Arbeit von De Bettignies *et al.* (1999), die *MID2* als Hochkopienzahl-Suppressor der synthetischen Letalität einer  $\Delta$ *slg1*  $\Delta$ *argd1*-Mutanten isolierten.

### 1.1.1.5 Andere Funktionen von Rho1p

Wie schon unter 1.1.1.4 beschrieben, aktiviert das GTP-gebundene Rho1p durch Bindung an die Proteinkinase C dieselbige (Kamada *et al.*, 1996; Nonaka *et al.*, 1995). Ferner bildet Rho1p in seiner GTP-gebundenen Form die regulatorische Untereinheit des Glucansynthase-Komplexes (Drgonová *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996). Es nimmt damit nicht nur eine indirekte Rolle bei der Erhaltung der Zellintegrität ein durch die Aktivierung der Proteinkinase C, sondern greift aktiv in die Zellwandsynthese ein. Auch durch die Beteiligung von Rho1p an der Polymerisierung des Aktins als Antwort auf Hitzestress kommt ihm eine aktive Rolle zu (Delley und Hall, 1999).

Desweiteren wird eine indirekte Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch Rho1p diskutiert, die über seine Bindung an das Formin-homologe Protein **Bni1p** (**b**ud **n**eck **i**nvolved) erfolgt (Kohno *et al.*, 1996). Bni1p greift zum einen über die Bindung seiner Prolin-reichen FH1-Domäne an das Aktin-Monomer-bindende Profilin (Kohno *et al.*, 1996), zum anderen über die Bindung an das F-Aktin-bindende und bündelnde EF1 $\alpha$  (Umikawa *et al.*, 1998) in die Regulation des Aktin-Zytoskeletts ein. Bni1p bindet auch an Spa2p (Fujiwara *et al.*, 1998), ein 180kD großes Protein, das an Orten polarisierten Wachstums lokalisiert (Snyder, 1989). Spa2p wiederum interagiert mit einem Septin, **Shs1p** [**s**eventh **h**omolog of **s**eptin] (Mino *et al.*, 1998). Daten von Fujiwara *et al.* (1998) deuteten an, daß Bni1p sowohl Spa2p als auch Rho1p für seine Lokalisierung an Orten des Zellwachstums benötigt, an denen Rho1p kolokalisiert und dann möglicherweise über Bni1p das Aktinzytoskelett reguliert.

Im Gegensatz dazu zeigten aber Helliwell *et al.* (1998b), daß Rho1p das Aktinzytoskelett über Pkc1p reguliert und Bni1p nicht an dieser Regulation beteiligt zu sein scheint.

Ein weiteres Zielprotein wurde mit **Skn7p** [**s**uppressor of **k**re **n**ine] identifiziert, nachdem mittels "Two-Hybrid"-System ein konserviertes Interaktionsmotiv für Rho1p postuliert war (Alberts *et al.*, 1998). Rho1p interagiert auch hier in seiner GTP-gebundenen Form sowohl im "Two-Hybrid"-System als auch in *in vitro*-Bindungsstudien. Skn7p stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der an der oxidativen Streß-Antwort beteiligt ist (Morgan *et al.*, 1997).

Auch Bem4p wurde als ein mit Rho1p interagierendes Protein beschrieben (Hirano *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 1996). Das kodierende Gen wurde als Hochkopienzahl-Suppressor einer dominant-negativen *rho1*-Mutanten isoliert (Hirano *et al.*, 1996). Hierbei interagiert Rho1p sowohl in seiner Nukleotid-freien, als auch in seiner GDP- oder GTP-gebundenen Form mit dem Bem4-Protein im "Two-Hybrid"-System. Die Funktion dieser Interaktion ist jedoch noch völlig unklar.

Neben den beschriebenen Funktionen scheint dem Rho1p auch eine Rolle beim Fortschreiten des Zellzyklus und bei der Polarisierung der Hefezelle zuzukommen (Drgonová *et al.*, 1999).

### 1.1.1.6 Ziele des MAP-Kinase-Moduls

Als Zielproteine sind hier Proteine zu nennen, deren Aktivität oder Funktion durch eine Pkc1p-Weg-abhängige Modifikation, wie z.B. durch Phosphorylierung, beeinflußt wird. Zum anderen gehören dazu auch Proteine, deren kodierende Gene transkriptionell vom Pkc1p-Weg reguliert werden.

#### 1.1.1.6.1 Direkte Zielproteine

Als direkte Zielproteine der MAP-Kinase Mpk1p wurden Rlm1p und der SBF-Komplex beschrieben. Mutationen im **RLM1**-Gen [**r**esistance to **l**ethality of **MKK1**<sup>P386</sup> overexpression] wurden bei der Suche nach Suppressoren des hyperaktiven **MKK1**<sup>P38</sup>-Allels isoliert (Watanabe *et al.*, 1995). Rlm1p weist in seinem N-terminalen Bereich Homologie zu den **MADS** (**M**CM1, **A**gamous, **D**eficiens and **S**erum factor)-Box-Transkriptionsfaktoren auf und reguliert in Abhängigkeit von Mpk1p seine eigene Expression (Dodou und Treisman, 1997).

"Two-Hybrid"-Experimente legten eine direkte Wechselwirkung zwischen Mpk1p und Rlm1p nahe (Watanabe *et al.*, 1995), die sich durch *in vitro*- und *in vivo*-Phosphorylierungsexperimente bestätigten (Watanabe *et al.*, 1997).

Neben Rlm1p wurde auch der heterodimere **SBF**-Komplex (**S**CB-**b**inding **f**actor), der sich aus der DNA-bindenden Untereinheit Swi4p und der regulatorischen Untereinheit Swi6p zusammensetzt, als direktes Ziel von Mpk1p identifiziert (Madden *et al.*, 1997). Der SBF-Komplex reguliert die Expression der G1-Cyclin-kodierender Gene *CLN1*, *CLN2*, *PCL1* und *PCL2* (Dirick *et al.*, 1995; Espinoza *et al.*, 1994; Ogas *et al.*, 1991). Dabei kommt hier die wichtigste Rolle wohl der Regulation von *PCL1* und *PCL2* zu, da zum einen deren Expression in  $\Delta mpk1$ -Mutanten vermindert ist (Madden *et al.*, 1997). Zum anderen kann die Überexpression von *CLN1* oder *CLN2* Pkc1p-Weg-Mutanten nicht retten (Iguar *et al.*, 1996). Außerdem scheint SBF auch Gene, die Zellwand-Proteine kodieren, zu regulieren (Iguar *et al.*, 1996).

Costigan *et al.* (1994) isolierten **NHP6A** (**n**on **h**istone **p**rotein) als Hochkopienzahl-Suppressor der synthetischen Letalität einer *slk1-1*  $\Delta spa2$ -Mutation. *NHP6A*, wie auch sein homologes Gen *NHP6B*, können beide die Phänotypen, wie Temperatur- und Koffein-Sensitivität von  $\Delta bck1$ - oder  $\Delta mpk1$ -Mutanten supprimieren und ihre Funktion wurde daher unterhalb von Mpk1p angeordnet. Da Nhp6A und Nhp6B jedoch keine Phosphoproteine sind und sie auch im "Two-Hybrid"-System keine Interaktion mit Mpk1p zeigen, ist es eher unwahrscheinlich, daß sie direkte Ziele von Mpk1p sind. Eine hinreichende Erklärung für die Funktion dieser Proteine im Pkc1p-Weg steht allerdings noch aus.

Als ein weiteres Zielprotein wurde ein RNA-Polymerase-Komplex postuliert, der auch die Proteinen Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, und Ccr4p enthält (Chang *et al.*, 1999). Dies wurde zum einen daraus geschlossen, daß Mutanten in den kodierenden Genen dieser Zusatzkomponenten eine verminderte Expression von Genen für Zellwandbiosynthese-Enzyme zeigen. Zum anderen haben diese Mutanten Pkc1p-Weg-typische Defekte (Zelllyse bei 38°C; Koffein-Sensitivität). Diese werden auch nicht durch die Deletion eines Gens für Komponenten des Pkc1p-Weges verstärkt. Eine direkte Phosphorylierung einer dieser Komponenten durch Mpk1p wurde bisher aber noch nicht gezeigt.

#### 1.1.1.6.2 Transkriptionell regulierte Gene

Obwohl dieser Weg durch Hitzestress induziert wird, werden Gene unter Kontrolle von Promotoren mit **HSE**- (**h**eat **s**hock **e**lements) oder **STRE**- (**s**tress **r**esponsive **e**lements) Sequenzen nicht in Abhängigkeit vom Pkc1p-Weg reguliert (Kamada *et al.*, 1995).

Es konnte aber gezeigt werden, daß die für Zellwandbiosynthese kodierenden Gene *FKS1*, *MNN1* und *CSD2* Pkc1p-abhängig exprimiert werden (Iguar *et al.*, 1996). Dies trifft auch für **FKS2** [**FK**506-sensitive], das für eine Untereinheit des Glucansynthase-Komplexes kodiert, zu (Zhao *et al.*, 1998). Dieses Gen wird jedoch nur bei Temperaturerhöhung Pkc1p-Weg-abhängig induziert, während seine Induktion ansonsten Calcineurin-abhängig erfolgt (Mazur *et al.*, 1995) und bei Glucose-Hunger vom Snf1p-regulierten Mig1p-Repressor reguliert wird. Bei einer "Mini-Array-Filter-Analyse" identifizierten Jung und Levin (1999) 23 Gene, deren Expression durch Mpk1p bzw. Rlm1p reguliert wird. Davon sind 5 Gene (*YOR382w*, *SPS100*, *YGP1*, *PGK1* und *CTT1*) negativ reguliert, während die übrigen 18 Gene (*PST1*, *SED1*, *CRH1*, *BGL2*, *MPK1*, *SEC28*, *YIL117C*, *CIS3*, *PIR2*, *CWP1*, *MLP1*, *PIR3*, *PIR1*, *YLR194c*, *SSR1*, *DFG5*, *YMR295c* und *YNL058c*) positiv reguliert werden. Die meisten dieser Gene kodieren für Zellwand-Proteine, die aufgrund experimenteller Ergebnisse oder durch Sequenzvergleiche zu den Glycosylphosphatidylinositol-modifizierten Proteinen bzw. zu Proteinen der PIR-Familie gezählt werden (vgl. 1.1.1.1). Aber auch Enzyme, die an der Biosynthese der Zellwand beteiligt sind oder für die bisher noch keine Funktion im Zusammenhang mit der Zellwand beschrieben werden konnte, sind darunter.

Im Gegensatz zu den von Jung und Levin (1999) publizierten Daten fanden Shimizu *et al.* (1994), daß das *BGL2*-Gen vom Pkc1p-Weg negativ reguliert wird. Sie zeigten, daß das Bgl2-Protein, eine  $\beta$ -Glucanase, verstärkt in *pkc1*-Mutanten produziert wird. Worauf diese unterschiedlichen Ergebnisse beruhen, ist unklar.

Da postuliert wurde, daß der Pkc1p-Weg nach Membran-Belastung aktiviert wird, könnten sich unter den Zielgenen auch solche befinden, deren Produkte die Membranfluidität heruntersetzen (Kamada *et al.*, 1995). Solche Gene wurden aber bisher noch nicht identifiziert.

### 1.1.1.7 Negativ-regulierende Faktoren des Weges

Signaltransduktionswege müssen nicht nur kontrolliert aktiviert, sondern gegebenenfalls auch wieder inaktiviert werden können. Mutanten, die zu einer ständigen Aktivierung des Pkc1p-Weges führen, zeigen toxische Effekte, wie z.B. Träger des *PKCI*<sup>R398A</sup>-Allels, des *MKK1*<sup>S386P</sup>-Allels, des *RHO1*<sup>Q68H</sup>-Allels oder des *RHO1*<sup>G19V</sup>-Allels (Madaule *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1995; Yashar *et al.*, 1995; Dodou und Treisman, 1997).

Bei der Suche nach negativ-regulierenden Proteinen fanden diese Allele Anwendung. So kodiert *MSG5* für eine dual-spezifische Protein-Phosphatase und wurde als Hochkopienzahl-Suppressor der Letalität einer *MKK1*<sup>P386</sup>-Überexpression isoliert (Watanabe *et al.*, 1995). Martín *et al.* (2000) konnten weiter zeigen, daß Msg5p tatsächlich am Pkc1p-vermittelten Signaltransduktionsweg beteiligt ist, da die *MSG5*-Überexpression eine verminderte Mpk1p-Phosphorylierung aufweist. Auch die Kältesensitivität einer  $\Delta$ *sac7*-Deletion wird durch die Überexpression des *MSG5*-Gens komplementiert. Die Deletion von *MSG5* hingegen führt zu einem erhöhten Anteil von phosphoryliertem Mpk1-Protein. Es ist bisher jedoch noch nicht bekannt, welches der Proteine des Weges von Msg5p tatsächlich dephosphoryliert wird.

Zellen, die das *PKCI*<sup>R398A</sup>-Allel exprimieren, zeigen Zellfusionsdefekte bei der Paarung (Philips und Herskowitz, 1997). Im Zusammenhang mit diesem Effekt konnte das Gen *KEL1* isoliert werden, deren Überexpression diesen Zellfusionsdefekt supprimiert. So wurde für dieses Protein eine Funktion bei der Hemmung der Proteinkinase C postuliert, wobei aber nicht ausgeschlossen werden konnte, daß Kellp möglicherweise parallel zum Pkc1p-Weg agiert (Philips und Herskowitz, 1998). Auch Zellen, die das hyperaktive *BCK1-20*-Allel exprimieren, haben eine verlängerte Generationszeit bei 30°C und 37°C im Vergleich zum Wildtyp (Lee und Levin, 1992).

Mattison *et al.* (1999) identifizierten **Ptp2p** und **Ptp3p** (protein tyrosine phosphatases) als zwei weitere, den Zellintegritätsweg negativ-regulierende Faktoren. Die Autoren konnten zeigen, daß beide Proteine die MAP-Kinase Mpk1p *in vivo* und *in vitro* dephosphorylieren, wobei Ptp2p eine höhere Spezifität aufweist.

Auch die GTPase-aktivierenden Proteine Sac7p und Bem2p, die schon unter 1.1.1.4 vorgestellt wurden, gehören zu den negativ-regulierenden Proteinen. So konnte bei den Deletionen von *BEM2* und *SAC7* eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Mpk1-Protein bei 30°C im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Martín *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Andere MAP-Kinase Wege in *S.cerevisiae*

Wie anfangs erwähnt, zeigen noch andere Signalübertragungswege in Hefe einen dem Pkc1p-Weg sehr ähnlichen modularen Aufbau. Die einzelnen Komponenten dieser Wege sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Jeder dieser Wege ist in zahlreichen Übersichtsartikeln (Tabelle 1.1) ausführlich beschrieben, wobei Tabelle 1.1 nur die neuesten wiedergibt.

MAP-Kinase-Wege	Übersichtsartikel
Paarungspheromon-Weg	Banuett, 1998; Gustin <i>et al.</i> , 1998; Sprague, Jr., 1998; Widmann <i>et al.</i> , 1999
Weg für invasives Wachstum in Haploiden	
Pseudohyphen-Weg in Diploiden	
HOG ["high osmolarity glycerol response"]-Weg	
Sporulations-Weg	

**Tabelle 1.1:** Weitere MAP-Kinase-Wege in *S.cerevisiae*

Da die Behandlung jedes einzelnen Weges den Rahmen dieser Einleitung sprengen würde, sollen an dieser Stelle nur die neueren Daten zum sogenannten "**SVG**"-Weg (**S**TE (sterile genes) **v**egenerative **g**rowth) berücksichtigt werden.

Dieser neue Signaltransduktionsweg wurde bei der Suche nach Mutanten entdeckt, für die die Deletion von *STE11* bei vegetativem Wachstum letal ist (Lee und Elion, 1999). Identifiziert wurde dabei eine *och1*-Mutante, die in Kombination mit der *ste11*-Mutanten, aber auch mit einer  $\Delta ste20$ - und einer  $\Delta ste7$ -Deletion letal war und einen verstärkten Phänotyp bei gleichzeitiger Deletion von *STE12* zeigte. Die Deletion von *STE4*, *STE5*, *RAS2* oder *TEC1* (spezifische Komponenten des Paarungspheromon-Weges bzw. für das invasive Wachstum bei Haploiden und Bildung von Pseudohyphen von Diploiden; Abbildung 1.1) hatten keinen Einfluß auf das Wachstum einer  $\Delta och1$ -Mutanten (Lee und Elion, 1999). Daraus schlossen die Autoren, daß Ste20p, als auch Ste11p und Ste12p an diesem neuen Weg beteiligt sein müssen. Andere Studien konnten auch noch eine Beteiligung von Ste50p, Ste7p, Kss1p und Sho1p zeigen (Cullen *et al.*, 2000).

Aktiviert wird dieser Weg in Mutanten mit Defekten in der Proteinglykosylierung, wie Mutanten mit einem Defekt in dem *OCH1*-Gen (Lee und Elion, 1999), das für eine Untereinheit der  $\alpha$ -1, 6-Mannosyltransferase kodiert (Nakayama *et al.*, 1992). Aber auch in anderen Proteinglykosylierungsmutanten wird dieser Weg benötigt (Cullen *et al.*, 2000). Da diese Proteinglykosylierungsmutanten, wie die  $\Delta och1$ -Mutante, Phänotypen wie Pkc1p-Weg-Mutanten (Sensitivität gegen SDS und "Calcofluor White") zeigen und durch die Überexpression von *PKC1* oder die Zugabe osmotischer Stabilisatoren gerettet werden können, wird für diesen Weg eine zum Pkc1p-Weg parallele Funktion postuliert (siehe auch 1.2.1.3).

## 1.2 Wechselwirkungen mit dem Pkc1p-Weg

In der Literatur sind zahlreiche Wechselwirkungen mit Komponenten des Pkc1p-Weges beschrieben (zur Übersicht: Heinisch *et al.*, 1999). Auf einige soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

### 1.2.1 Quervernetzungen mit anderen MAP-Kinase-Wegen

Immer mehr Hinweise zeigen, daß viele Proteine der Signaltransduktion von mehreren Wegen benutzt werden. Die Spezifität der einzelnen Wege liegt offenbar eher in den verschiedenen Rezeptoren, die das Signal empfangen und in den jeweils aktivierten Transkriptionsfaktoren, die verschiedene Antworten vermitteln, als in den übrigen Komponenten. Ebenso könnte die jeweilige Lokalisierung, sowie die zelluläre Konzentration der Proteine für deren Funktion entscheidend sein.

### 1.2.1.1 Quervernetzungen mit dem "Pheromon response"-Weg

Erste Hinweise auf eine Verbindung zwischen dem Pkc1p- und dem Paarungsweg stammen aus Untersuchungen von Costigan *et al.* (1992), die zeigten, daß Mutanten des Pkc1p-Weges, wie z.B.  $\Delta bck1$ -Mutanten, nicht mehr in der Lage sind, korrekte Paarungsprojektionen auszubilden.

Weitere Daten, die eine Quervernetzung der beiden Wege andeuten, resultierten aus der Beobachtung, daß die Funktion eines hyperaktiven  $STE7^{P368}$ -Allel durch die gleichzeitige Expression von  $BCK1$  verstärkt wird (Inagaki *et al.*, 1999). Auch für andere Gene, wie das  $STE20$ -Gen oder den  $MAT$ -Locus konnte ihre Suppressionsfähigkeit einer Pkc1p-Weg-Mutanten, der  $slg1$ -Mutanten, gezeigt werden (Jacoby *et al.*, 1998; Verna und Ballester, 1999).

Ein anderes Beispiel für eine Verbindung zwischen den beiden Wegen ist die Beteiligung der Phosphatase Msg5p. Diese ist nicht nur an der Dephosphorylierung von Mpk1p beteiligt (Martín *et al.*, 2000), sondern auch an der Dephosphorylierung von Fus3p bei der Adaptation an Paarungspheromon (Doi *et al.*, 1994).

Eine Quervernetzung der beiden Wege wurde auch schon früher aufgrund von Untersuchungen von Errede *et al.* (1995) vermutet. Sie zeigten, daß  $\Delta mpk1$ -Mutanten eine reduzierte Paarungseffizienz aufweisen und bei der Bildung von Paarungsprojektionen lysieren. Ebenso fanden sie, daß die Gabe von Pheromon die Aktivität der MAP-Kinase Mpk1p erhöht. Im Gegensatz zu einer Aktivitätserhöhung der MAP-Kinasen des Paarungsweges, die sich schon nach 2-3min zeigt, ist die Erhöhung der Mpk1p-Aktivität erst nach 1h zu sehen, so daß man davon ausgehen muß, daß der Paarungsweg möglicherweise ein Signal erzeugt, das dann den Pkc1p-Weg aktiviert. Diese Vermutung wurde erhärtet durch den Befund, daß für diese Pheromon-abhängige Aktivierung von Mpk1p die Proteinbiosynthese benötigt wird und es sich bei dem Signal um ein neusynthetisiertes Protein handeln könnte (Buehrer und Errede, 1997).

Zarrov *et al.* (1996) postulierten durch den Nachweis der fehlenden Pheromon-abhängigen Tyrosin-Phosphorylierung von Mpk1p in  $\Delta ste20$ -Mutanten, Ste20p als möglichen Verzweigungspunkt des Paarungspheromonweges und des Pkc1p-Weges. Dies konnte jedoch von Buehrer und Errede (1997) widerlegt werden, da sie zeigten, daß eine Tyrosin-Phosphorylierung von Mpk1p nicht zwangsläufig mit einer Aktivitätserhöhung einhergeht. So fanden sie in  $\Delta ste12$ -Mutanten eine Tyrosin-Phosphorylierung von Mpk1p, die aber nicht zu einer Aktivitätserhöhung führte. Daraus schlossen sie, daß für die Pheromon-abhängige Aktivierung von Mpk1p ein vollständiger Paarungsweg benötigt wird. Außerdem scheint die Pheromon-induzierte Mpk1p-Phosphorylierung unterhalb oder oberhalb von Bck1p zu greifen, da sich in  $\Delta bck1$ -Mutanten noch eine Pheromon-abhängige Mpk1p-Phosphorylierung findet, in  $\Delta mkk1/\Delta mkk2$ -Mutanten jedoch nicht. Mögliche Proteine, die an einer Verbindung beider Wege beteiligt sind, könnten Spa2p und Sph1p sein, da sie mit Komponenten beider Wege interagieren (Roemer *et al.*, 1998; Sheu *et al.*, 1998). Außerdem ist in  $\Delta spa2$ -Mutanten die Pheromon-abhängige Mpk1p-Aktivierung verzögert (Buehrer und Errede, 1997).

Obwohl zahlreiche Verbindungen zwischen dem Pkc1p- und dem Paarungsweg gefunden wurden, ist das verbindende "Glied" dieser beiden Wege jedoch noch nicht identifiziert.

### 1.2.1.2 Wechselwirkungen mit dem HOG-Weg

Da sowohl der Pkc1p-Weg, als auch der HOG-Weg die Antwort auf osmolare Bedingungen regulieren, kann man vermuten, daß diese sich möglicherweise auch gegenseitig regulieren.

Davenport *et al.* (1995) fanden, daß Mutanten, die Defekte in Pkc1p-Weg-Komponenten haben, einen kleineren Anteil an phosphoryliertem Hog1-Protein haben, während Transformanten, die beispielsweise das  $MPK1$ -Gen überexprimieren auch eine größere Menge an Tyrosin-phosphoryliertem Hog1-Protein haben. Diese Daten wiesen auf eine ähnliche Regulation mancher Komponenten hin.

Ein weiteres Beispiel für eine Komponente, die von beiden Wegen ähnlich beeinflusst wird, ist das Skn7-Protein. So wurde Skn7p zum einen als Zielprotein von Rho1p beschrieben (Alberts *et al.*, 1998). Ebenso erhöht die Überexpression von *MID2* die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung von Skn7p (Ketela *et al.*, 1999). Im HOG-Weg stellt Skn7p auch ein Ziel von Sln1p dar, indem es durch Phosphotransfer die Transkriptionsaktivität von Skn7p erhöht (Ketela *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998).

Komponenten, die von beiden Wegen benutzt werden, stellen die Proteinphosphatasen Ptp2p und Ptp3p dar. So können beide Phosphatasen die Proteine Mpk1p und Hog1p, aber auch die MAP-Kinase des Pheromon-Weges, Fus3p, dephosphorylieren, wobei Ptp2p Hog1p und Mpk1p mit höherer Spezifität erkennt, Ptp3p jedoch Fus3p als Substrat bevorzugt (Mattison *et al.*, 1999). Diese Spezifität könnte möglicherweise auf die Lokalisierung der Proteine zurückzuführen sein. Ptp2p ist bevorzugt im Zellkern, während sich Ptp3p vornehmlich im Zytoplasma befindet (Mattison *et al.*, 1999).

Lee und Elion (1999) fanden, daß die Deletion von *PBS2*  $\Delta$ *bck1*-Mutanten supprimieren kann. Eine Erklärung dafür wäre, daß Hog1p (die MAP-Kinase des durch hohe Osmolarität induzierten Weges; Abbildung 1.1) als negativer Regulator des "SVG"-Weges agiert (siehe 1.2.1.3), da sich auch eine erhöhte *FKS2*-Expression in *hog1*-Mutanten zeigte.

### 1.2.1.3 Funktionen in Zusammenhang mit dem "SVG"-Weg

Wie schon unter 1.1.2 beschrieben scheint dem "SVG"-Weg eine zum Pkc1p-Weg parallele Funktion zuzukommen, da dieser Weg in Proteinglykosylierungsmutanten, die auch Zellwanddefekte zeigen, aktiviert wird. Diese überlappenden Funktionen werden auch durch die Tatsache unterstrichen, daß Mutanten, die gleichzeitig Defekte in beiden Wegen aufweisen, einen synthetisch letalen Phänotyp zeigen (Lee und Elion, 1999). Ebenso kann eine Erhöhung der "SVG"-Weg-Aktivität die Phänotypen von  $\Delta$ *bck1*-Mutanten supprimieren. Zum anderen regulieren beide Wege mindestens ein gleiches Gen, das *FKS2*-Gen. Bei dieser transkriptionellen Kontrolle agieren die beiden Wege jedoch nicht völlig identisch. Bei vegetativem Wachstum (bei 30°C) wird dieses Gen nicht vom Pkc1p-Weg induziert, da beispielsweise die Expression des *FKS2*-Gens in  $\Delta$ *bck1*-Mutanten nicht erniedrigt ist. Erst als Antwort auf einen milden Hitzeschock wird die Expression von *FKS2* durch Bck1p gesteigert (Zhao *et al.*, 1998).

### 1.2.2 Andere Wechselwirkungen des Pkc1p-Weges

Da die Wechselwirkung zwischen den Komponenten des Pkc1p-Weges und anderen zellulären Ereignissen zahlreich und teilweise recht unverstanden sind, sei hier auf eine Zusammenfassung genetischer Untersuchungen in Heinisch *et al.* (1999) hingewiesen. Die wichtigsten Wechselwirkungen sollen im Folgenden jedoch kurz erläutert werden.

Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Regulation des Zellzyklus und der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion lieferten Untersuchungen an *cdc28*-Mutanten. Cdc28p ist die den Zellzyklus-regulierende, Cyclin-abhängige Kinase (Lew und Reed, 1995). So postulierten Mazzoni *et al.* (1993) als erste eine Beteiligung von Mpk1p an der Knospentbildung parallel zu Cdc28p oder unterhalb von Cdc28p, da sie ein neues *mpk1*-Mutanten-Allel, das *slt2-1*-Allel, in einem "Screen" nach Mutanten, die einen synthetisch letalen Phänotyp mit *cdc28-109*-Mutanten zeigen, isolierten.

Auch Marini *et al.* (1996) identifizierten eine *pkc1*-Mutante bei der Suche nach Mutanten, die den Defekt einer Temperatur-sensitiven *cdc28-4*-Mutanten verstärkten.

Außerdem konnten die Autoren zeigen, daß Cdc28p die Aktivität von Mpk1p stimuliert. Im Gegensatz dazu stehen Daten von Kamada *et al.* (1995), die keine Zellzyklus-regulierte

Aktivierung von Mpk1p zeigen konnten. Jedoch beobachteten auch Zarzov *et al.* (1996) eine verzögerte Phosphorylierung von Mpk1p in Temperatur-sensitiven *cdc28*-Mutanten bei Erhöhung der Temperatur auf 37°C. Diese Daten ordnen den Pkc1p-Weg eher unterhalb oder parallel zu Cdc28p ein.

Andere Daten deuten aber auch eine regulatorische Funktion des Mpk1p-Weges im Zellzyklus an. Mizunuma *et al.* (1998) zeigten, daß durch eine Calcium-abhängige Aktivierung von Mpk1p Hsl1p, ein negativer Regulator von Swe1p, gehemmt wird. Swe1p wiederum kann dann nicht mehr als negativer Regulator des Cdc28-Clb-Komplexes agieren, was zu einer Verzögerung in der G2-Phase beim Übergang in die Mitose führt. Auch für Bck1p wurde eine Funktion gefunden, die für das Fortschreiten des Zellzyklus von Bedeutung ist. *BCK1* ist nötig für die durch die Überexpression von *POG1*-induzierte (**p**romotor **o**f **g**rowth) erhöhte *CLN2*-Expression (Leza und Elion, 1999), die zu einer Aufhebung des Pheromon-induzierten G1-Arrestes und damit zur Adaptation führt.

Eine andere Funktion des Pkc1p-Weges innerhalb des Zellzyklus scheint in der Regulation der Spindelpolkkörper-Duplikation zu liegen (Khalfan *et al.*, 2000). Diese Vermutung resultiert aus Experimenten, bei denen *PKC1* und *SLG1* als Hochkopienzahl-Suppressoren der Temperatur-Sensitivität einer  $\Delta$ *dsk2*  $\Delta$ *rad23*-Mutanten isoliert wurden. Es zeigte sich, daß für die Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von Spc110p, einer Komponente des Spindelpolkkörpers (Mirzayan *et al.*, 1992), der Pkc1p-Weg nötig ist (Khalfan *et al.*, 2000).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich keiner der Wege dem anderen unterordnen läßt und es sich wohl um ein komplexes Zusammenspiel beider Wege handelt.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Trotz weltweiter Anstrengungen sind aufgrund eines hohen Grades an Komplexität bisher immer noch nicht alle Komponenten der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion beschrieben, geschweige denn ihre Wirkmechanismen, Wechselwirkungen und Funktionen in verschiedenen Wegen verstanden.

Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- i) Es sollte die Charakterisierung und Identifizierung der sogenannten *ubk1*-Mutanten, die bei der Suche nach oberhalb der MAP-Kinase-Kinase-Kinase Bck1p agierenden Komponenten isoliert wurde (Jacoby, 1997), erfolgen.
- ii) Ferner sollte ein weiterer Mutanten-Stamm, Y1-1, charakterisiert und beschrieben werden.
- iii) Ausgehend von der Identifizierung der mutierten Gene der beiden Mutanten sollten die Wirkmechanismen der entsprechenden Proteine und eine Einordnung innerhalb der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion erfolgen.
- iv) Um weitere Einblicke in die Pkc1p-vermittelte Signaltransduktion zu gewinnen, sollten noch vergleichende Untersuchungen zum Pkc1p-Weg in der zu *S.cerevisiae* nahe verwandten Hefe *K.lactis* durchgeführt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Antikörper

##### 2.1.1.1 Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese Gel-30, Roth, Karlsruhe), Adenin (Serva, Heidelberg), Agar (Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England) oder Difco (Laboratories, Inc., Detroit)), Ultrapure-Agarose (Gibco BRL, Gaithersburg MD USA), Ammoniumacetat (Acros, New Jersey, USA), Ammoniumpersulfat (Merck, Darmstadt), Ampicillin-Natriumsalz (Roth, Karlsruhe), Antipain (Sigma, St. Louis, USA), Aprotinin (Sigma, St. Louis, USA), L-Arginin (Janssen Chimica, Geel, Belgien), Bicin (Serva, Heidelberg), Blockierungsreagenz (Roche, Mannheim), Borsäure (Roth, Karlsruhe), 5- Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat [=BCIP] (BioTech Trade & Service GmbH, Heidelberg), Bromphenolblau (Janssen Chimica, Geel, Belgien), BSA [Albumin bovine fraction V pH7,0] (Serva, Heidelberg), Calciumchlorid (Acros, New Jersey, USA), Chymostatin (Sigma, St. Louis, USA), Coomassie (Serva, Heidelberg), CSPD [Disodium3-(4-methoxy Spiro[1, 2-dioxytane-3, 2'-5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3.7</sup>]decan}-4-yl)phenylphosphat; Chemilumineszenz-Substrat] (Tropix, Bedford, Massachusetts), Dimethylformamid (Merck, Darmstadt), dNTP's (Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA), Essigsäure (Roth, Karlsruhe), Ethanol (Riedel-de Haën, Seelze), Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt), Ethylenglykol (Acros, New Jersey, USA), G418-Sulfat (CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM (UK) LTD, Beeston, Nottingham), Galaktose (Acros, New Jersey, USA), Glukose (Caesar & Loretz GmbH, Hilden), Glutathion, reduziertes (Sigma, St. Louis, USA), GTP- $\gamma$ -S (Sigma, St. Louis, USA), Glycerin (Roth, Karlsruhe), Glycin (Fluka, Steinheim), Hefeextrakt (Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England) oder Difco (Laboratories, Inc., Detroit), Heringsperma-DNA (Roche, Mannheim), L-Histidin (Fluka, Steinheim), IPTG (Roth), L-Isoleucin (Roth, Karlsruhe), Isopropanol (Merck, Darmstadt), Kaliumacetat (J.T.Baker, Deventer), Kaliumchlorid (Roth, Karlsruhe), Kanamycin (Serva, Heidelberg), Koffein (Sigma, St. Louis, USA), Kongo-Rot (Merck, Darmstadt), Lambda-DNA (MBI Fermentas, St.Leon-Rot), N-Lauroylsarcosin (Serva, Heidelberg), L-Leucin (Merck, Darmstadt), Leupeptin (Sigma, St. Louis, USA), Lithiumacetat (Sigma, St. Louis, USA), L-Lysin (Riedel-de Haën, Seelze), Magermilchpulver (Heirler, Radolfzell), Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt), Magnesiumsulfat (J.T.Baker, Deventer), Maleinsäure (Fluka, Steinheim), Manganchlorid (Riedel-de-Haën, Seelze),  $\beta$ -Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe), Methanol (J.T.Baker, Deventer), L-Methionin (Merck, Darmstadt), Mineralöl (Sigma, St. Louis, USA), Natriumacetat (Acros, New Jersey, USA), Natriumcarbonat (Riedel-de- Haën, Seelze), Natriumchlorid (Riedel-de-Haën, Seelze), Natriumdodecylsulfat [=SDS] (Serva, Heidelberg), Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt), Natriumperchlorat (J.T.Baker, Deventer), Natriumpyrophosphat (Sigma, St. Louis, USA), NBT (Sigma, St. Louis, USA), ONPG [o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid] (Sigma, St. Louis, USA), Pepstatin (Sigma, St. Louis, USA), Pepton (Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England) oder Difco (Laboratories, Inc., Detroit), Phenol (Roth, Karlsruhe), DL-Phenylalanin (Acros, New Jersey, USA), PMSF (Serva, Heidelberg), Polyethylenglykol 1000 (Roth, Karlsruhe), Polyethylenglykol 3350 (Sigma, St. Louis, USA), Rubidiumchlorid (Sigma, St. Louis, USA), S<sup>35</sup>-dATP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), Salzsäure (Riedel-de-Haen, Seelze), Sequagel-6 (National Diagnostics, Hull, England), D-Sorbitol (,St. Louis, USA), Sucrose (Sigma, St. Louis, USA), "SuperSignal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate" (Pierce, Rockford, IL),

N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin [=Temed] (Merck, Darmstadt), L-Threonin (Merck, Darmstadt), Titriplex III [=EDTA] (Merck, Darmstadt), Titriplex VI [=EGTA] (Merck, Darmstadt), Tris (Roth, Karlsruhe), Triton X-100 (Serva, Heidelberg), Trypton (Difco Laboratories, Inc., Detroit), L-Tryptophan (Roth, Karlsruhe), Tween-20 (Merck, Darmstadt), L-Tyrosin (Acros, New Jersey, USA), Uracil (Sigma, St. Louis, USA), L-Valin (Fluka, Steinheim), YNB w/o amino acids (Difco Laboratories, Inc., Detroit), X-Gal [=5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid] (Sigma, St. Louis, USA), Xylencyanol (Sigma, St. Louis, USA)

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien

3MM Chromatographie Papier (Whatman, Maidstone), "DIG Luminescent Detection Kit" (Roche, Mannheim), "Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System" (Roche, Mannheim), Glasperlen [ $\varnothing$  = 0,45 - 0,5 mm; B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen], Glutathion-Sepharose (Pharmacia), "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche, Mannheim), "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche, Mannheim), Hybond<sup>TM</sup>-N Nylon Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), Prep-A-Gene<sup>®</sup> DNA Purification Kit (BIO-RAD, München), "Prestained SDS Molecular Weight Markers" (Sigma, St. Louis, USA), Protan BA Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell, Dassel), Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz, Heidelberg), Immobilon P-Membran (Millipore/Eschborn), Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB/Bad Homburg)

### 2.1.1.3 Enzyme

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

Weitere verwendete Enzyme waren: Alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim), T4-Ligase (New England Biolabs Inc., Frankfurt), Ribonuklease A (Sigma, St. Louis, USA), Zymolyase-100T (Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan),  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase (Roche, Mannheim).

### 2.1.1.4 Verwendete Antikörper

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
monoklonaler c-myc Antikörper (9E10) aus Maus (CALBIOCHEM-NOVABIOCHEM (UK) LTD, Beeston, Nottingham)	an die alkalische Phosphatase gekoppeltes anti-Maus IgG (H+L) aus Ziege (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc)
Affinitäts-gereinigter, polyklonaler anti-GST (Z-5) Antikörper aus Kaninchen (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg)	an die alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Kaninchen IgG (H+L) aus Ziege
polyklonaler, in Kaninchen erzeugter und Protein A-Chromatographie- und Phosphopeptid Affinitäts-Säulengereinigter Phospho-spezifischer p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper (New England Biolabs Inc., Frankfurt) gegen ein synthetisches Phospho-Threonin/Tyrosin-Peptid der menschlichen MAP-Kinase p44	Peroxidase-konjugierter AffiniPure Anti-Kaninchen IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc)
MPK1 (yN-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) ein in Ziegen hergestellter polyklonaler Antikörper, der gegen das Mpk1-Protein aus <i>S.cerevisiae</i> gerichtet ist	in Esel hergestelltes, Peroxidase-konjugiertes anti-Ziege IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg)

**Tabelle 2.1: Antikörper-Kombinationen. Die verwendeten Verdünnungen sind der Vorschrift der Western-Analyse (2.2.16.6) zu entnehmen.**

## 2.1.2 Stämme und Medien

## 2.1.2.1 Hefestämme

2.1.2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* -Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
CH1113	<i>MATa ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	D. Koshland, persönliche Mitteilung
Y1	<i>MAT a ubk1 ade2 ade 3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	Jacoby (1997)
Y1-1	<i>MAT a ubk1 Δlrg1::mTn-lacZ/LEU2 ade2 ade 3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	J.Jacoby
SNY1	<i>MAT a slg1::mTn-lacZ/LEU2 ade2 ade 3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	Nilius (1997)
CALY1-A	<i>MATa Δtrp::loxP-KanMX-loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY2-A	<i>MATa Δtrp::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY2-D	<i>MATa/MATα Δtrp::loxP/Δtrp::loxP ade2/ade2 ade3/ade3 his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3 can1/can1 sap3/sap3</i> (mit YCpHO diploid-gemachter CALY2-A)	diese Arbeit
CALY2-4C	<i>MATa Δtrp::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i> (Spore aus CALY2-D)	diese Arbeit
CALY2-4D	<i>MATα Δtrp::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i> (Spore aus CALY2-D)	diese Arbeit
CALY3-A	<i>MATa Δlrg1::loxP-KanMX-loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY4-A	<i>MATa Δlrg1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY5-A	<i>MATa ubk1 Δlrg1::loxP-KanMX-loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY6-A	<i>MATa ubk1 Δlrg1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY7-A	<i>MATa Δlrg1-GAP-Domäne::URA3 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY8-A	<i>MATa ubk1 Δlrg1-GAP-Domäne::URA3 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY10-3B	<i>MATα ubk1 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i> (Spore aus CALY10-D)	diese Arbeit
CALY10-D	<i>MATa/MATα ubk1/ubk1 ade2/ade2 ade3/ade3 his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3 can1/can1 sap3/sap3</i>	diese Arbeit
CALY11-D	<i>MATa/MATα ubk1/UBK1 Δtrp1::loxP/TRP1 ade2/ade2 ade3/ade3 his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3 can1/can1 sap3/sap3</i> (aus Kreuzung CALY10-3B mit CALY2-A)	diese Arbeit
CALY11-3A	<i>MATa ubk1 TRP1 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i> (Spore von CALY11-D)	diese Arbeit
CALY11-3C	<i>MATα ubk1 Δtrp1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i> (Spore von CALY11-D)	diese Arbeit
CALY11-7A	<i>MATa ubk1 Δtrp1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i> (Spore von CALY11-D)	diese Arbeit
CALY11-7C	<i>MATa ubk1 TRP1 ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i> (Spore von CALY11-D)	diese Arbeit
CALY12-D	<i>MATa/MATα Δrom2::loxP-KanMX-loxP/ROM2 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP ade2/ade2 ade3/ade3 his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3 can1/can1 sap3/sap3</i>	diese Arbeit
CALY12-2A	<i>MATa Δrom2::loxP-KanMX-loxP Δtrp1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY12-2C	<i>MATα Δrom2::loxP-KanMX-loxP Δtrp1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY13-A1	<i>MAT a ubk1Δlrg1::mTn-lacZ/LEU2-YIp5 ade2 ade 3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY13-A2	<i>MAT a ubk1Δlrg1::mTn-lacZ/LEU2-YIp5 ade2 ade 3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY13-A3	<i>MAT a ubk1Δlrg1::mTn-lacZ/LEU2-YIp5 ade2 ade 3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY13-A4	<i>MAT a ubk1Δlrg1::mTn-lacZ/LEU2-YIp5 ade2 ade 3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit

CALY14-D	<i>MATa/MATα rom2-ΔPH-Domäne::loxP-KanMX-loxP/ROM2 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP ade2/ade2 ade3/ade3 his3/his3 leu2/leu2 ura3/ura3 can1/can1 sap3/sap3</i>	diese Arbeit
CALY14-1D	<i>MATa rom2-ΔPH-Domäne::loxP-KanMX-loxP Δtrp1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
CALY14-1B	<i>MATα rom2-ΔPH-Domäne::loxP-KanMX-loxP Δtrp1::loxP ade2 ade3 his3 leu2 ura3 can1 sap3</i>	diese Arbeit
ALCM1-D	<i>MATa/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ROM2 ade2/ADE2 ade3/ADE3 his3/his3-11,15 leu2/leu2-3,112 Δtrp1::loxP/TRP1 ura3/ura3-52 (Diploide aus CH1113 und MALY7-7B)</i>	diese Arbeit
ALCM2-D	<i>MATa/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ROM2 Δslg1::mTn-lacZ/LEU2/SLG1 ade2/ADE2 ade3/ADE3 his3/his3-11,15 leu2/leu2-3,112 Δtrp1::loxP/TRP1 ura3/ura3-52 (Diploide aus SNY1 und MALY7-7B)</i>	diese Arbeit
ALCM3-D	<i>MATa/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ubk1 ade2/ADE2 ade3/ADE3 his3/his3-11,15 leu2/leu2-3,112 Δtrp1::loxP/TRP1 ura3/ura3-52 (Diploide aus Y1 und MALY7-7B)</i>	diese Arbeit
ALCM4-D	<i>MATa/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ubk1 ade2/ADE2 ade3/ADE3 his3/his3-11,15 leu2/leu2-3,112 Δtrp1::loxP/TRP1 ura3/ura3-52 (Diploide aus CALY11-3A und MALY7-7B)</i>	diese Arbeit
ALCM5-D	<i>MATa/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ubk1 ade2/ADE2 ade3/ADE3 his3/his3-11,15 leu2/leu2-3,112 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP ura3/ura3-52 (Diploide aus CALY11-3C und MALY7-4C)</i>	diese Arbeit
HD56-5A	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i>	Arvanitidis und Heinisch (1994)
MCY-7B (MCH-7B)	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	Jacoby <i>et al.</i> , (1999)
MCY-22D	<i>MATa/MATα ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL (korrespondierender diploider Stamm zu MCY-7B)</i>	J. Heinisch
MCY-23D	<i>MATa/MATα PKC1/Δpkc1::HIS3 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	Hans-Peter Schmitz
MALY1-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::loxP-KanMX-loxP/LRG1 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY1-4A	<i>MATα Δlrg1::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY1-4B	<i>MATa Δlrg1::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY1-4D	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY2-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::loxP/LRG1 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY3-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::loxP/Δlrg1::his5<sup>+</sup> ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY3-1A	<i>MATa Δlrg1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY3-1B	<i>MATa Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY3-1C	<i>MATα Δlrg1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY3-1D	<i>MATα Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY4-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::loxP/LRG1 Δbck1::his5<sup>+</sup>/BCK1 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY4-1A	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit

MALY4-1B	<i>MATα Δlrg1::loxP Δbck1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY4-2A	<i>MATα Δbck1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY4-2C	<i>MATa Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY4-3B	<i>MATa Δbck1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY4-5A	<i>MATα Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY4-9C	<i>MATa Δlrg1::loxP Δbck1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::loxP/LRG1 Δmpk1::ScLEU2/MPK1 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-3D	<i>MATa Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-3C	<i>MATα Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-3A	<i>MATa Δmpk1::ScLEU2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-3B	<i>MATα Δmpk1::ScLEU2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-6A	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-6B	<i>MATa Δlrg1::loxP Δmpk1::ScLEU2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY5-6C	<i>MATα Δlrg1::loxP Δmpk1::ScLEU2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::loxP/LRG1 Δslg1::his5<sup>+</sup>/SLG1 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-1C	<i>MATa Δlrg1::loxP Δslg1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-3A	<i>MATα Δslg1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-3B	<i>MATa Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-3C	<i>MATa Δslg1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-3D	<i>MATα Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-4B	<i>MATα Δlrg1::loxP Δslg1::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY6-5D	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY7-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::loxP/LRG1 Δrom2::his5<sup>+</sup>/ROM2 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY7-2A	<i>MATα Δlrg1::loxP Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY7-2D	<i>MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY7-2C	<i>MATa Δlrg1::loxP Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY7-4A	<i>MATα Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY7-4C	<i>MATa Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY7-5A	<i>MATa Δlrg1::loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit

MALY7-7B	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY8-D	<i>MATα/MATα Δlrg1::loxP/LRG1 Δpkc1::ScHIS3/PKC1 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-D	<i>MATα/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ROM2 Δbem2::loxP-KanMX-loxP/BEM2 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-2A	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> Δbem2::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-2B	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-2C	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-2D	<i>MATα Δbem2::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-4A	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> Δbem2::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-4B	<i>MATα Δbem2::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY11-4C	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-D	<i>MATα/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ROM2 Δsac7::loxP-KanMX-loxP/SAC7 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-1A	<i>MATα Δsac7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-1B	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-1C	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-1D	<i>MATα Δsac7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-5B	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-7A	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> Δsac7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY12-7C	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> Δsac7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-D	<i>MATα/MATα Δrom2::his5<sup>+</sup>/ROM2 Δbag7::loxP-KanMX-loxP/BAG7 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-2B	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> Δbag7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-2C	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-2D	<i>MATα Δbag7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-3A	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-3B	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> Δbag7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-3C	<i>MATα Δrom2::his5<sup>+</sup> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY13-3D	<i>MATα Δbag7::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY14-D	<i>MATα/MATα lrg1-ΔGAP-Domäne::URA3/LRG1 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL</i>	diese Arbeit

	<i>SUC/SUC GAL/GAL</i>	
MALY14-1B	<i>MATa lrg1-ΔGAP-Domäne::URA3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY14-1D	<i>MATα lrg1-ΔGAP-Domäne::URA3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY15-D	<i>MATa/MATα rom2-ΔPH-Domäne::loxP-KanMX-loxP/ROM2 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
MALY15-3C	<i>MATa rom2-ΔPH-Domäne::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY15-3B	<i>MATα rom2-ΔPH-Domäne::loxP-KanMX-loxP ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
MALY16-D	<i>MATa/MATα Δlrg1::his5<sup>+</sup>/LRG1 Δsac7::loxP-KanMX-loxP/SAC7 ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 Δtrp1::loxP/Δtrp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i>	diese Arbeit
SH100	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 his4 HMLa ade2 tor2::ADE2 YCplac111::TOR2</i>	Helliwell <i>et al.</i> , (1998a)
SH121	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 his4 HMLa ade2 tor2::ADE2 YCplac111::tor2-21</i>	Helliwell <i>et al.</i> , (1998a)
SH229	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 HMLa ade2 his3 tor1::HIS3 tor2::ADE2 YCplac111::tor2-29</i>	Helliwell <i>et al.</i> , (1998a)
SH221	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 HMLa ade2 his3 tor1::HIS3 tor2::ADE2 YCplac111::tor2-21</i>	Helliwell <i>et al.</i> , (1998a)
SHAL1	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 his4 HMLa ade2 Δlrg1::loxP-KanMX-loxP tor2::ADE2 YCplac111::TOR2</i>	diese Arbeit
SHAL2	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 his4 HMLa ade2 Δlrg1::loxP-KanMX-loxP tor2::ADE2 YCplac111::tor2-21</i>	diese Arbeit
SHAL3	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 HMLa ade2 his3 Δlrg1::loxP-KanMX-loxP tor1::HIS3 tor2::ADE2 YCplac111::tor2-21</i>	diese Arbeit
SHAL4	<i>MATa leu2-3,112 trp1 ura3 rme1 HMLa ade2 his3 Δlrg1::loxP-KanMX-loxP tor1::HIS3 tor2::ADE2 YCplac111::tor2-29</i>	diese Arbeit
OHNY1	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2</i>	Nonaka <i>et al.</i> , (1995)
HNY21	<i>MATa ura3 leu2 trp1 his3 ade2 rho1-104</i>	Yamochi <i>et al.</i> , (1994)
HYAL1	<i>MATa Δlrg1::loxP-KanMX-loxP ura3 leu2 trp1 his3 ade2</i>	diese Arbeit
HYAL2	<i>MATa Δlrg1::loxP-KanMX-loxP ura3 leu2 trp1 his3 ade2 rho1-104</i>	diese Arbeit
HYAL3	<i>MATa Δlrg1::his5<sup>+</sup> ura3 leu2 trp1 his3 ade2</i>	diese Arbeit
HYAL4	<i>MATa Δlrg1::his5<sup>+</sup> ura3 leu2 trp1 his3 ade2 rho1-104</i>	diese Arbeit
DL40	<i>MATαa ade2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 LYS2::lexA-HIS3/LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ/ URA3::lexA-lacZ (isogener Diploider von L40)</i>	Marcus <i>et al.</i> , (1994)
LD3R-7B	<i>MATa leu1 SUC3 mal0</i>	S.Hohmann
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , (1996)
SMC-19A	<i>MATα leu1 MAL2-8<sup>c</sup> MAL3 SUC3</i>	F.K. Zimmermann
YJJ3-2A	<i>MATa Δmpk1::ScLEU2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 MAL SUC GAL</i>	Kirchrath <i>et al.</i> , (2000)

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete *S.cerevisiae* –Stämme

2.1.2.1.2 *Kluyveromyces lactis* -Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
KB6-2CΔ4	<i>MATa Klbc1::HIS3 ura3-12 his3-35 ade</i>	Jacoby <i>et al.</i> , (1999)
HK14-1A	<i>MATa Klmpk1::URA3 leu2 uraA1-1</i>	J.Heinisch
HK14-1D	<i>MATa ade2-1 leu2 uraA1-1 trp1 his</i>	J.Heinisch

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit verwendete *K.lactis* -Stämme

## 2.1.2.2 Medien zur Anzucht der Hefestämme

Vollmedium (YEP) : 1% Hefeextrakt, 2% Pepton 190,  
Kohlenstoffquelle: 2% Glucose (YEPD)  
bzw. 2% Galaktose(YEPGal)

Minimalmedium : 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB)  
Aminosäurebedürfnisse wie bei Zimmermann (1975)  
beschrieben;  
Kohlenstoffquelle (2% Glucose bzw. 2% Galaktose)

Zur Herstellung von Platten wurde dem Medium 1,2% Agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) oder 2% Agar (Difco Laboratories, Inc., Detroit) zugegeben. Die Anzucht erfolgte, je nach Stamm, bei 25°C, 30°C oder 37°C.

Osmotisch stabilisierendes Medium wurde durch Zugabe von 1M Sorbit erhalten.

Bei der Verwendung von Koffein-haltigem Medium wurde das Medium wie gewöhnlich hergestellt und durch Zugabe einer 100mM steril-filtrierte Koffein-Stammlösung nach dem Autoklavieren auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Zur Selektion auf Geneticin-Resistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren festes G418-Sulfat bis zu einer Endkonzentration von 200mg/l zugegeben, das sich durch Rühren löste.

## 2.1.2.3 Lagerung der Hefestämme

Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte auf Platte bei 4°C. Alle 2-3 Monate wurden diese auf frische Nährböden überimpft.

Zusätzlich wurden Glycerinkulturen angelegt, indem 500µl frische Übernacht-Kultur mit 500µl steriler, 50%iger Glycerin-Lösung gemischt wurden, um dann bei -70°C gelagert zu werden.

## 2.1.2.4 Bakterienstämme

2.1.2.4.1 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm:	Genotyp:	Quelle:
DH5αF'	F' Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>deoR thi-1</i> <i>supE44 λ<sup>-</sup> gyrA96 relA1</i>	Gibco BRL (Gaithersburg MD USA)
DM1	F', <i>dam</i> <sup>-13::Tn9</sup> (Cm <sup>R</sup> ), <i>dcm</i> <sup>-</sup> <i>mcrB</i> <i>hsdR</i> <sup>-</sup> <i>M</i> <sup>+</sup> , <i>gal1</i> , <i>gal2</i> , <i>ara</i> <sup>-</sup> <i>lac</i> <sup>-</sup> , <i>thr</i> <sup>-</sup> , <i>leu</i> <sup>-</sup> , <i>ton</i> <sup>R</sup> , <i>tsx</i> <sup>R</sup> , <i>Su</i> <sup>0</sup>	Gibco BRL (Gaithersburg MD USA)

### 2.1.2.5 Medien zur Anzucht der Bakterien

Vollmedium (LB): 1% Trypton (Pepton 140), 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl

Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 50mg/l oder Kanamycin in einer Konzentration von 25mg/l zugegeben. Feste Nährböden wurden durch Zugabe von 1,2% Agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) oder 2% Agar (Difco Laboratories, Inc., Detroit) erhalten. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C.

Zum Nachweis der Farbreaktion bei Komplementation des  $\alpha$ -Peptids wurden zusätzlich 100 $\mu$ l einer IPTG/X-Gal-Stammlösung (2,4mg/ml IPTG, 10mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (DMF) gelöst) auf den Platten ausgestrichen.

### 2.1.2.6 Lagerung der Bakterienstämme

Die Lagerung der Bakterien betrug längstenfalls 1 bis 2 Monate bei 4°C.

## 2.1.3 Verwendete Plasmide und Genbanken

### 2.1.3.1 Ausgangsplasmide

#### 2.1.3.1.1 Bakterienplasmide

Name	Selektionsmarker	Beschreibung	Quelle
pCSLT2:: LEU2	<i>Amp<sup>R</sup></i>	pUC19-Derivat, das die flankierenden Bereiche des <i>MPK1</i> -Gens trägt, bei dem aber 1403 Basenpaare des offenen Leserahmens und 240 Basenpaare des Promotors mit dem <i>LEU2</i> -Gen ersetzt sind	Jacoby (1997)
pFA6a- HIS3MX6	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Plasmid, das das <i>his5<sup>+</sup></i> -Gen von <i>S.pombe</i> unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und terminiert vom TEF-Terminator enthält	Wach <i>et al.</i> (1997)
pFA6a- 13Myc- kanMX6	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>KanMX<sup>R</sup></i>	Plasmid, das für einen 13fachen myc-Tag kodiert, terminiert vom <i>ADHI</i> -Terminator und als Selektionsmarker das <i>KanMX</i> -Resistenz-Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und den TEF-Terminator enthält	Longtine <i>et al.</i> (1998)
pK8039	<i>Kan<sup>R</sup></i>	pUK21-Derivat, das das mit den Oligonukleotiden p8039.3-5 und p8039.3-3 amplifizierte, <i>Bgl</i> III/ <i>Hind</i> III-geschnittene <i>ROM2</i> -Gen aus dem Stamm VW1A enthält	Jacoby (1997)
pUC19	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pUC21	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor	Vieira und Messing, (1991)
pUG6	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>KanMX<sup>R</sup></i>	Plasmid, das das Kanamycin-Resistenz-Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und TEF-Terminators jeweils flankiert von der 34bp- <i>loxP</i> -Erkennungssequenz enthält	Güldener <i>et al.</i> (1996)

pUG6lacZ	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>KanMX<sup>R</sup></i>	pUG6-Derivat, das vor der <i>KanMX</i> -Kassette das <i>lacZ</i> -Gen in entgegengesetzter Orientierung wie das Ampicillin-Resistenz-Gen enthält	E.Boles, persönliche Mitteilung
----------	--	--	---------------------------------

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Bakterien-Ausgangsplasmide in alphabetischer Reihenfolge

## 2.1.3.1.2 Hefepiasmide

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Beschreibung	Quelle
pABCK1-20	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>URA3/ADE3</i> <i>CEN/ARS</i>	Vektor, der für das mutante, hyperaktive Bck1-20-Protein kodiert	Jacoby (1997)
pBTM116	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	Derivat, das für die DNA-Bindedomäne des <i>lexA</i> -Proteins kodiert, wobei das kodierende Gen unter der Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors steht mit <i>ADHI</i> -Terminator	Bartel <i>et al.</i> (1993)
pBTM116-HA-RHO2ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho2ΔC-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pBTM116-HA-RHO2ΔC(Q65L)	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho2ΔC(Q65L)-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pBTM116-HA-RHO3ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho3ΔC-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pBTM116-HA-RHO3ΔC(Q74L)	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho3ΔC(Q74L)-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pBTM116-HA-RHO4ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho4ΔC-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pBTM116-HA-RHO4ΔC(Q70L)	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho4ΔC(Q70L)-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pBTM116-HA-RHO4ΔC(T25N)	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho4ΔC(T25N)-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pBTM116-HA-CDC42ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Cdc42ΔC-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)

pBTM116-HA-CDC42ΔC (G12V)	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Cdc42ΔC(G12V)-Fusionsprotein kodiert	Imamura <i>et al.</i> (1997)
pCXJ20	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2/</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>K.lactis/E.coli</i> "Shuttle-Vektor"	Chen (1996)
pGAD424	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2/</i> <i>2μ</i>	Vektor, der die für die Transkriptionsaktivierungsdomäne des Gal4-Proteins kodierende Sequenz unter der Kontrolle des <i>ADH1</i> -Promotors enthält mit <i>ADH1</i> -Terminator	Bartel <i>et al.</i> (1993)
pGBT9	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	Vektor, der die für die DNA-Binde-Domäne des Gal4-Proteins kodierende Sequenz unter der Kontrolle des <i>ADH1</i> -Promotors enthält mit <i>ADH1</i> -Terminator	Bartel <i>et al.</i> (1993)
pHPS45	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	pGBT9-Derivat, das für eine Gal4p-Bindedomänen-Rho1(C206S)-Fusion kodiert	Hans-Peter Schmitz, dieses Labor
pHPS49	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	pGBT9-Derivat, das für eine Gal4p-Bindedomänen-Rho1(Q68H,C206S)-Fusion kodiert	Hans-Peter Schmitz, dieses Labor
pHPS100	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>CEN/ARS</i>	Vektor, der für ein <i>lexA</i> -Rlm1ΔN-Fusionsprotein und die β-Galaktosidase unter Kontrolle eines Promotors, der 5 <i>lexA</i> -Bindestellen enthält, kodiert	Kirchrath <i>et al.</i> (2000)
pHPS106	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3/</i> <i>2μ</i>	YEp352-Derivat, das für ein Rho1-GST Fusionsprotein kodiert	Hans-Peter Schmitz, dieses Labor
pHPS119	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	pGBT9-Derivat, das für eine Gal4p-Bindedomänen-Rho5ΔC (Q91H)-Fusion kodiert	Hans-Peter Schmitz, dieses Labor
pHPS120	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	pGBT9-Derivat, das für eine Gal4p-Bindedomänen-Rho5ΔC-Fusion kodiert	Hans-Peter Schmitz, dieses Labor
pJJH399	<i>Amp<sup>R</sup>/Tet<sup>R</sup></i> <i>KanMX/</i> <i>ARS</i>	YRp7-Derivat, bei dem das <i>TRP1</i> -Gen durch <i>loxP-KanMX-loxP</i> -Deletionskassette ersetzt ist	Jürgen Heinisch
pJJH447	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3/</i> <i>2μ</i>	YEp352-Derivat, das den <i>GALI</i> -Promotor enthält	Jürgen Heinisch
pJJH803	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3/</i> <i>2μ</i>	Dieses Plasmid enthält das <i>KIMPK1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>GALI</i> -Promotors in dem <i>S.cerevisiae/E.coli</i> "Shuttle-Vektor" YEp352	Kirchrath <i>et al.</i> (2000)

pJJH806	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2/</i> <i>CEN/ARS</i>	Dieses Plasmid enthält das <i>KIMP1</i> -Gen unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors in dem <i>K.lactis/E.coli</i> Shuttle-Vektor pCXJ20	Kirchrath <i>et al.</i> (2000)
pJK4	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2</i> <i>CEN/ARS</i>	YCplac111-Derivat, das für das Tor2-Protein kodiert	M.Hall
plexAG1-WT	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	pBTM1116-Derivat, das für ein <i>lexA-K1Gal1</i> -Fusionsprotein kodiert	Vollenbroich <i>et al.</i> (1999)
pSH47	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3</i> <i>CEN/ARS</i>	p416/ <i>GAL1</i> -Derivat, das für die Cre-Rekombinase kodiert, wobei das kodierende Gen unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors steht	Güldener <i>et al.</i> (1996)
pTD1	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2/</i> <i>2μ</i>	pGAD424-Derivat, das für eine Gal4-Aktivierungsdomänen-T-Antigen-Fusion kodiert	Iwabuchi <i>et al.</i> (1993)
pVA3	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>TRP1/</i> <i>2μ</i>	pGBT9-Derivat, das für eine Gal4-Bindedomänen-p53-Fusion kodiert	Iwabuchi <i>et al.</i> (1993)
pVKG80-WT	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2/</i> <i>2μ</i>	pASV1-Derivat, das für ein Vp16-K1Gal80-Fusionsprotein kodiert	Vollenbroich <i>et al.</i> (1999)
YCp33	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3/</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor	Gietz und Sugino (1988)
YCp111	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2/</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor	Gietz und Sugino (1988)
YCpHO	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3/</i> <i>CEN/ARS</i>	YCp50-Derivat, das für die HO-Endonuklease kodiert	Russell <i>et al.</i> (1986)
YEplac24	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3/</i> <i>2μ</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor	Botstein <i>et al.</i> (1979)
YEplac352	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>URA3/</i> <i>2μ</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor	Hill <i>et al.</i> (1986)
YEplac181	<i>Amp<sup>R</sup>/</i> <i>LEU2/</i> <i>2μ</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -Shuttle-Vektor	Gietz und Sugino (1988)

YEplac195	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>URA3</i> / 2 $\mu$	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -”Shuttle-Vektor”	Gietz und Sugino (1988)
YIplac128	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>LEU2</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -”Shuttle-Vektor” , für <i>S.cerevisiae</i> als integrativen Vektor verwendet	Gietz und Sugino (1988)
YIplac204	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -”Shuttle-Vektor” , für <i>S.cerevisiae</i> als integrativen Vektor verwendet	Gietz und Sugino (1988)
YIplac211	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>URA3</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -”Shuttle-Vektor” , für <i>S.cerevisiae</i> als integrativen Vektor verwendet	Gietz und Sugino (1988)

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Hefe-Ausgangsplasmide in alphabetischer Reihenfolge

### 2.1.3.2 Plasmidkonstruktionen dieser Arbeit

#### 2.1.3.2.1 Bakterienplasmide

Name	Selektionsmarker	Konstruktion
pAL166	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Plasmid, das nach Integration von YIp5 in das Genom von Y1-1, anschließendem Schneiden und Ligieren, isoliert wurde (siehe 2.2.5.1). Es enthält das Transposon flankierende Sequenzen.
pAL184	<i>Amp<sup>R</sup></i>	In den <i>Bam</i> HI-geschnittenen pUC19 wurde ein 0,3kb großes <i>Bam</i> HI-Fragment aus der ST-PCR der Mutanten 22-8 kloniert.
pAL185	<i>Amp<sup>R</sup></i>	In den <i>Bam</i> HI-geschnittenen pUC19 wurde ein 0,5kb großes <i>Bam</i> HI-Fragment aus der ST-PCR der Mutanten 26-6 kloniert.
pAL186	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Ein 0,3kb großes <i>Bam</i> HI-Fragment aus der ST-PCR der Mutanten 29-3 wurde in den <i>Bam</i> HI-geschnittenen pUC19 kloniert.
pAL189	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Mit <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-geschnittener Vektor pUC19, in den ein 707bp großes <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-Fragment des mit den Oligonukleotiden U-200 und LRG1-3 amplifizierten PCR-Produktes aus dem Stamm Y1-1 kloniert wurde
pAL190	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Mit <i>Pst</i> I-geschnittener Vektor pUC19, in den das 1451bp große <i>Pst</i> I-Fragment des mit den Oligonukleotiden LRG1-5 und LEU2-5out amplifizierten PCR-Produktes aus dem Stamm Y1-1 kloniert wurde. Dabei befindet sich der Teil des offenen Leseraters des <i>LRG1</i> -Gens in der entgegengesetzten Orientierung wie das Ampicillin-Resistenzgen.
pAL191	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Mit <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III-geschnittener Vektor pUC19, in den das 1721bp große <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III-Fragment des mit den Oligonukleotiden LRG1-5 und LRG1-3 amplifizierten PCR-Produktes aus dem Stamm MCY-22D kloniert wurde
pAL192	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Hier wurde ein internes, 709bp großes <i>Bam</i> HI/ <i>Cla</i> I-Fragment aus pAL191, das für die GAP-Domäne des <i>LRG1</i> -Gens kodiert, durch ein 1517bp <i>Bam</i> HI/ <i>Cla</i> I- <i>URA3</i> -Fragment aus dem Vektor YEpl24 ersetzt.
pAL212	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Mit <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI geschnittener Vektor pUC21, der das mit den Oligonukleotiden SAC7-ATG und SAC7-3neu amplifizierte und mit <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI-geschnittene PCR-Fragment des <i>SAC7</i> -Gens aus dem Stamm MCY-7B enthält.

Tabelle 2.6: In dieser Arbeit konstruierte Bakterien-Plasmide in numerischer Reihenfolge

## 2.1.3.2.2 Hefepiasmide

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion
pAL138	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>LEU2</i> / 2 $\mu$	Dieses Plasmid kodiert für eine Fusion aus Gal4-Aktivierungsdomäne und den C-terminalen Aminosäuren 568-1017 des Lrg1-Proteins. Dazu wurde pAL224 mit <i>PstI</i> geschnitten und das 8236bp große Fragment religiert.
pAL144	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	<i>HindIII</i> -geschnittener Vektor YCplac33, in den das 3734bp- <i>HindIII</i> -geschnittene <i>WSC3</i> -PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden WSC3-5' und WSC3-3' von dem Stamm MCY-22D erzeugt wurde, kloniert wurde.
pAL150	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / 2 $\mu$	Der mit <i>HindIII</i> geschnittene Vektor pJJH447 enthält das mit den Oligonukleotiden LRG1-ATG und LRG1-3 amplifizierte und mit <i>HindIII</i> -geschnittene PCR-Produkt des <i>LRG1</i> -Gens aus dem Stamm HD56-5A. Dabei ist die Orientierung so gewählt, daß sich das <i>LRG1</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>GAL1/10</i> -Promotors befindet.
pAL156	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	In den 5568bp <i>PstI/EcoRI</i> -geschnittenen Vektor YCplac33 wurde das 2930bp <i>PstI/EcoRI</i> -geschnittene <i>TAT2</i> -PCR-Produkt, synthetisiert mit den Oligonukleotiden TAT2-5 und TAT2-3 aus dem Stamm CH1113, kloniert.
pAL158	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / 2 $\mu$	In den 5206bp <i>PstI/EcoRI</i> -geschnittenen Vektor YEplac195 wurde das 2930bp <i>PstI/EcoRI</i> -geschnittene <i>TAT2</i> -PCR-Produkt, hergestellt mit den Oligonukleotiden TAT2-5 und TAT2-3 aus dem Stamm CH1113, kloniert.
pAL160	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	Der 5583bp große <i>BamHI/SphI</i> -geschnittene Vektor YCplac33 enthält das 3258bp <i>BglII/SphI</i> -geschnittene <i>TAT1</i> -PCR-Produkt, synthetisiert mit den Oligonukleotiden TAT1-5 und TAT1-3 aus dem Stamm CH1113.
pAL162	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / 2 $\mu$	In den 5221bp <i>BamHI/SphI</i> -geschnittenen Vektor YEplac195 wurde das 3258bp <i>BglII/SphI</i> -geschnittene <i>TAT1</i> -PCR-Produkt, hergestellt mit den Oligonukleotiden TAT1-5 und TAT1-3 aus dem Stamm CH1113, kloniert.
pAL164 -A, -B und -C	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	Der 5603bp <i>Asp718I</i> -geschnittene Vektor YCplac33 enthält das 3188bp <i>Asp718I</i> -geschnittene <i>SKM1</i> -PCR-Produkt, synthetisiert mit den Oligonukleotiden SKM1-5 und SKM1-3 aus den Stämmen MCY-22D (A), CH1113 (B) und Y1 (C), kloniert.
pAL165 -A, -B und -C	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / 2 $\mu$	In den 5603bp <i>Asp718I</i> -geschnittenen Vektor YEplac195 wurde das 3188bp <i>Asp718I</i> -geschnittene <i>SKM1</i> -PCR-Produkt, erzeugt mit den Oligonukleotiden SKM1-5 und SKM1-3 aus den Stämmen MCY-22D (A), CH1113 (B) und Y1 (C), kloniert.
pAL167 -A, -B und -C	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	Der 5591bp <i>BamHI/SalI</i> geschnittene YCplac33 enthält das 4085bp <i>BamHI/SalI</i> -geschnittene PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden YOR165-5 und YOR165-3 aus den Stämmen MCY-22D (-A) bzw. CH1113 (-B) synthetisiert wurde.
pAL168 -A, -B und -C	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	In den <i>BamHI/HindIII</i> -geschnittenen YCplac33 wurde das 1515bp- <i>BglII/HindIII-SMP3</i> -PCR-Fragment, hergestellt mit den Oligonukleotiden SMP3-5 und SMP3-3 aus den Stämmen MCY-22D (-A), CH1113 (-B) und Y1 (-C) kloniert
pAL169 -A, -B und -C	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	In den <i>BamHI/HindIII</i> -geschnittenen YCplac33 wurde das 2408bp <i>BglII/HindIII-SMP3</i> -Fragment, synthetisiert mit den Oligonukleotiden SMP3-5 und SMP3-3 aus den Stämmen MCY-22D (A), CH1113 (B) und Y1 (C), kloniert.

pAL170	<i>Amp<sup>R</sup></i> / keiner	Ein mit den Oligonukleotiden Chr15-L1-5 und Chr15-L1-3 erzeugtes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113, das mit <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I geschnitten wurde, wurde in den <i>Bg</i> II/ <i>Sal</i> I-geschnittenen Vektor pUG6 kloniert.
pAL171	<i>Amp<sup>R</sup></i> / keiner	Ein mit den Oligonukleotiden Chr15-L2-5 und Chr15-L2-3 erzeugtes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113 wurde in den <i>Bg</i> II/ <i>Sal</i> I-geschnittenen Vektor pUG6 kloniert, nachdem es mit <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I geschnitten wurde.
pAL172	<i>Amp<sup>R</sup></i> / keiner	Ein mit den Oligonukleotiden Chr15-L3-5 und Chr15-L3-3 erzeugtes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113, das mit <i>Bg</i> II/ <i>Sal</i> I geschnitten wurde, wurde in den <i>Bg</i> II/ <i>Sal</i> I-geschnittenen Vektor pUG6 kloniert.
pAL173	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>URA3</i> / keiner	In den mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenen Vektor YIplac211 wurde ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R1-5 und Chr15-R1-3 synthetisiertes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113 kloniert, das zuvor mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III geschnitten wurde.
pAL175	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>URA3</i> / keiner	Der mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittene Vektor YIplac211 enthält ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R3-5 und Chr15-R3-3 erzeugtes, mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III geschnittenes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113.
pAL176	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / keiner	Ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R4-5 und Chr15-R4-3 erzeugtes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113 wurde in den <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenen Vektor YIplac204 kloniert, nachdem es mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III geschnitten wurde.
pAL177	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / keiner	In den mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenen Vektor YIplac204 wurde ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R5-5 und Chr15-R5-3 erzeugtes, mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113 kloniert.
pAL178	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>TRP1</i> / keiner	Der mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittene Vektor YIplac204 enthält ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R6-5 und Chr15-R6-3 synthetisiertes, <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113.
pAL179	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>LEU2</i> / keiner	Ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R7-5 und Chr15-R7-3 erzeugtes, mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113 wurde in den mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenen Vektor YIplac128 kloniert.
pAL180	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>LEU2</i> / keiner	In den mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenen Vektor YIplac128 wurde ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R8-5 und Chr15-R8-3 synthetisiertes, mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113 kloniert.
pAL181	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>LEU2</i> / keiner	Der mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittene Vektor YIplac128 enthält ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R9-5 und Chr15-R9-3 erzeugtes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113, das zur Klonierung mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III geschnitten wurde.
pAL182	<i>Amp<sup>R</sup></i> / <i>URA3</i> / keiner	Ein mit den Oligonukleotiden Chr15-R2-5neu und Chr15-R2-3neu erzeugtes, mit <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III geschnittenes PCR-Fragment von Chromosom XV des Stammes CH1113 wurde in den <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-geschnittenen Vektor YIplac211 kloniert.

pAL183	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3/</i> 2μ	Das Plasmid pAL150 wurde mit einem von dem Plasmid pFA6a-13Myc-kanMX6 mit den Oligonukleotiden LRG1c-tag-5 und LRG1c-tag-3 synthetisierten PCR-Produkt kotransformiert, so daß dieses Plasmid nach einer <i>in-vivo</i> Rekombination für ein Lrg1-13myc-Fusionsprotein kodiert. Das das Fusionsprotein kodierende Gen befindet sich dabei unter der Kontrolle des <i>GALI/10</i> -Promotors. Zusätzlich befindet sich hinter dem für das Fusionsprotein kodierenden Gen die <i>loxP-KanMX-loxP</i> -Kassette.
pAL193	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3/</i> <i>CEN/ARS</i>	Das 6283bp <i>BglII/HindIII-ROM2</i> -Gen aus pK8039 wurde in den mit <i>BamHI/HindIII</i> -geschnittenen YCplac33 kloniert.
pAL194	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>LEU2/</i> <i>CEN/ARS</i>	In den mit <i>BamHI/HindIII</i> -geschnittenen YCplac111 wurde das 6283bp <i>BglII/HindIII</i> -Fragment aus pK8039, das das <i>ROM2</i> -Gen trägt, kloniert.
pAL204	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3/</i> 2μ	In den mit <i>BamHI/HindIII</i> -geschnittenen Vektor pJH447 wurde das mit den Oligonukleotiden GAP-LRG1 und LRG1-3 amplifizierte und mit <i>BamHI/HindIII</i> -geschnittene 1093bp große PCR-Fragment des <i>LRG1</i> -Gens, das für die GAP-Domäne kodiert, aus dem Stamm MCY-22D kloniert. Dabei befindet sich das für die GAP-Domäne kodierende Fragment unter der Kontrolle des <i>GALI/10</i> -Promotors.
pAL213	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3/</i> 2μ	In den mit <i>BamHI/SphI</i> -geschnittenen pJH447 wurde das mit <i>BamHI/SphI</i> -geschnittene 2284bp große Fragment aus dem Plasmid pAL212 kloniert. Dabei befindet sich das <i>SAC7</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>GALI/10</i> -Promotors.
pAL222hin -A, -B und - C	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3/</i> <i>CEN/ARS</i>	Ein mit <i>Asp718I</i> geschnittenes, 4249bp großes <i>YOR322c</i> -PCR-Produkt, synthetisiert mit den Oligonukleotiden YOR322-5 und YOR322-3 aus den Stämmen HD56-5A (A), CH1113 (B) und Y1 (C), wurde in den mit <i>Asp718I</i> geschnittenen Vektor YCplac33 kloniert. Dabei ist das <i>YOR322c</i> -Gen in der gleichen Orientierung angeordnet wie das Ampicillin-Resistenz-Gen.
pAL223hin- A, -B, -C	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3/</i> 2μ	In den mit <i>Asp718I</i> geschnittenen Vektor YEplac195 wurde ein mit <i>Asp718I</i> geschnittenes <i>YOR322c</i> -PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden YOR322-5 und YOR322-3 aus den Stämmen HD56-5A (A), CH1113 (B) und Y1 (C) synthetisiert wurde, kloniert. Dabei ist das <i>YOR322c</i> -Gen in der gleichen Orientierung angeordnet wie das Ampicillin-Resistenz-Gen.
pAL224	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>LEU2/</i> 2μ	Der mit dem <i>BglII</i> geschnittene "Two-Hybrid"- Vektor pGAD424 wurde mit einem mit den Oligonukleotiden pLRG1-5 und pLRG1-3 amplifizierten 3390bp großen PCR-Fragment aus dem Stamm MCY-7B zur <i>in vivo</i> -Rekombination kotransformiert. Das Plasmid kodiert damit für ein Gal4-Aktivierungsdomäne-Lrg1-Fusionsprotein.
pAL228	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1/</i> 2μ	Ein 1,181bp großes, mit <i>EcoRI/BglII</i> geschnittenes Fragment, das mit den Oligonukleotiden SLG1-5THS und pSLG1-3 aus dem Stamm MCY-7B erzeugt wurde, wurde in den <i>EcoRI/BamHI</i> -geschnittenen Vektor pGBT9 kloniert. Damit kodiert dieses Plasmid für eine Fusion aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und den C-terminalen Aminosäuren 288-378 des Slg1-Proteins.
pAL229	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1/</i> 2μ	Ein 428bp großes, mit <i>EcoRI/BamHI</i> geschnittenes-Fragment, das mit den Oligonukleotiden MID2-5THS und MID2-3THS aus dem Stamm MCY-7B erzeugt wurde, wurde in den mit <i>EcoRI/BamHI</i> -geschnittenen Vektor pGBT9 kloniert. Damit kodiert dieses Plasmid für eine Fusion aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und den C-terminalen Aminosäuren 251-376 des Mid2-Proteins.

pAL230	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>LEU2</i> / 2μ	Das mit den Oligonukleotiden LRG1-5THS und LRG1-3THS synthetisierte PCR-Produkt aus dem Stamm MCY-7B wurde mit dem mit <i>EcoRI</i> -geschnittenen Vektor pGAD424 zur <i>in vivo</i> -Rekombination kotransformiert. Damit kodiert dieses Plasmid für ein Fusionsprotein aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und den N-Terminalen Aminosäuren 1-579 des Lrg1-Proteins.
--------	---	--

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit konstruierte Hefe-Plasmide in numerischer Reihenfolge

### 2.1.3.3 Plasmide zur Sequenzierung des *ROM2*-Gens

Name	Selektionsmarker/ Replikationsmodul	Konstruktion
pAL195 -A, -B, -C, -C, -D, -E, -F	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	In den in <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III geschnittenen Vektor YCplac33 wurde ein 6283bp <i>Bgl</i> II/ <i>Hind</i> III-geschnittenes PCR-Produkt, das mit den Oligonukleotiden p8039.3-5 und p8039.3-3 aus den Stämmen CH1113 (A), CALY11-3A (B), CALY11-3C (C), CALY11-7A (D), CALY11-7C (E) und Y1 (F) synthetisiert wurde, kloniert.
pAL196 -A-E	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	Die Plasmide pAL195 A-F wurden mit <i>EcoRI</i> geschnitten und ein 6551bp großes Fragment wurde religiert.
pAL197-F	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> / <i>CEN/ARS</i>	Das Plasmid pAL195F wurde mit <i>SacI</i> geschnitten und ein 7497bp großes Fragment wurde religiert.
pAL198-F	<i>Amp<sup>R</sup></i>	In den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor pUC19 wurde ein 795bp großes <i>EcoRI/NsiI</i> -Fragment aus pAL195F kloniert.
pAL199-F	<i>Amp<sup>R</sup></i>	In den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor pUC19 wurde ein 889bp großes <i>EcoRI/NsiI</i> -Fragment aus pAL195F kloniert.
pAL205 hin-F	<i>Amp<sup>R</sup></i>	In den mit <i>EcoRI</i> geschnittenen Vektor pUC19 wurde ein 2289bp großes <i>EcoRI</i> -Fragment aus pAL195F kloniert, so daß der Teil des offenen Leserahmens des <i>ROM2</i> -Gens in entgegengesetzter Orientierung zum Ampicillin-Resistenz-Gen sitzt.

Tabelle 2.8: In dieser Arbeit zur Sequenzierung des *ROM2*-Gens konstruierte Plasmide in numerischer Reihenfolge

### 2.1.3.4 Verwendete Transposon-Genbank

Die Transposon-Genbank wurde von M.Snyder freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um 2-3kb große, *Sau3A*-geschnittene Fragmente in dem Vektor pHSS6, die dann mit dem Transposon *mTn-lacZ/LEU2* mutagenisiert wurden (Burns *et al.*, 1994; P.Ross-MacDonald, persönliche Mitteilung).

### 2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

## 2.1.4.1 Oligonukleotide zur Klonierung, PCR-Überprüfung oder Sequenzierung

Name	Sequenz
BAG7-ATG	5'- GCG <b>CGG ATC</b> CGA ATG TTT AAC ATG AAT CTA CTT TCT AC - 3'
BAG7-5	5'- GCG <b>CGG ATC</b> CAC TTT AGG TTC TGA CCC - 3'
BAG7-3	5'- GCG <b>CGG ATC</b> CCT ACC AAG GTA ATT CAG GTT C - 3'
BCK1-5	5'- GCA AGC GGA GGT GGG TGA C - 3'
BCK1-3	5'- GCC CTT CAG CGA AGA GG - 3'
BEM2-5	5'- CCG <b>CGT CGA</b> CCC TCA GAG ACG AAG AGC TGA GC - 3'
BEM2-3	5'- CCG <b>CGT CGA</b> CCC TAT CGC TGG CGC TTC CCC CAC - 3'
Chr15-L1-5	5'- GAA GAT CTT GCG CAG AAG TTG - 3'
Chr15-L1-3	5'- CTG CCA TTT TTG GTA GCA CC - 3'
Chr15-L2-5	5'- CCA TAA GTG TTT TAG TGA CC - 3'
Chr15-L2-3	5'- CGC ATC TTG CTT TTC CGA ATG - 3'
Chr15-L3-5	5'- GCG TTT ATT GTA TCC CTT GAC - 3'
Chr15-L3-3	5'- GGT AGA TAG CTT GAG GCA C - 3'
Chr15-R1-5	5'- GCC GTT AGA CTA GCA GTC GG - 3'
Chr15-R1-3	5'- GGC ACG TAT ACA CAT GTA CG - 3'
Chr15-R2-5neu	5'- CAG GAC GGC AAG AGA AG - 3'
Chr15-R2-3 neu	5'- CGC TAT GTC GGC TGC CAC - 3'
Chr15-R3-5	5'- GGA TAT TAA TGT CTT TGC TGG G - 3'
Chr15-R3-5	5'- GGA TAT TAA TGT CTT TGC TGG G - 3'
Chr15-R4-5	5'- CGT TTT CTC TAA CTG GGC CC - 3'
Chr15-R4-3	5'- CCA TTG GGC TCC GGA GGG AAC C - 3'
Chr15-R5-5	5'- CCT TAA GCC AAC GAG GTA G - 3'
Chr15-R5-3	5'- CTC ATG CCA AGA TTC CAG CC - 3'
Chr15-R6-5	5'- CCT CAC CAA ATA TCT CCA CC - 3'
Chr15-R6-3	5'- GAG CCG GAG GTT CTA AGC - 3'
Chr15-R7-5	5'- GCC TAG TCA AAA GAG GTG CC - 3'
Chr15-R8-5	5'- CAG TCT TAG AAG CAG CAG - 3'
Chr15-R8-3	5'- CTA AAT TTT CCC TCT CCA TTC - 3'
Chr15-R9-5	5'- GAA CAA GGA ACA CTT ATA GAC C - 3'
Chr15-R9-3	5'- CGC GGA GAG GAC CAT GTC TG - 3'
GAP-LRG1	5'- GGG GAA GCT TAT GGT GAA GAT <b>TAG GAT CCC</b> C - 3'
LEU2-5out	5'- CAA TGT AGG GAA TTC G - 3'
LRG1-ATG	5'- GGG <b>GAA GCT</b> TAT GAT TCA AAA TTC TGC TGG - 3'
LRG1-3	5'- GGG <b>GAA GCT</b> TCT GCT GTT GGA GAT GTT CTG - 3'
LRG1-5	5'- GGG <b>GAA GCT</b> TGG AAG TAG GAA ATA GCT GTG - 3'
LRG1-5THS	5'- CGA TGA TGA AGA TAC CCC ACC AAA CCC AAA AAA AGA GAT CGA AAT GAT TCA AAA TTC TGC TGG - 3'
LRG1-3THS	5'- CAT AGA TCT CTG CAG GTC GAC GGA TCC CCG GGA ATT CGA TCC TCC TTG TTT TGT CGG G - 3'
LRG1-1501	5'- GCC CTA GTC AAA TCA AGA AC - 3'
LRG1-1738c	5'- CTC CTT GTT TTG TCG GGT C - 3'

LRG1-2584	5'- CGC AAT TTA CTG GAG GC - 3'
LRG1c-tag-5	5'- GTC ACA GTC AAA GAT TCG ACC ACA ACG GTC ATA CAA GGT GAA ATA AAC AAA CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA - 3'
LRG1c-tag-3	5'- GTC CAT TTC CAT AGC ATA CTG GTA AGA TTT TAT TGA AAT AGG CAA AGG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C - 3'
MID2-5THS	5'- GGC <u>GGG AAT TCC</u> AAT CAT CAA GGA CGG ACT TTA TT - 3'
MID2-3THS	5'- GGC <u>GGG ATC CGA</u> AAA GTA GCC ATA AGC AC - 3'
p8039.3-5	5'- GCC AAT GAC AGA GGA AGA GC - 3'
p8039.3-3	5'- GAA GCG AGT GAA GAG CTG TC - 3'
pLRG1-5	5'- GAT CGA ATT CCC GGG GAT CCG TCG ACC TGCAGA GAT CTA TAT GAT TCA AAA TTC TGC TGG - 3'
pLRG1-3	5'- GAG ATG GTG CAC GAT GCA CAG TTG AAG TGA ACT TGC GGG GGT CGA CGG CGA GTA ATA CAA TGA TAC - 3'
pSLG1-5	5'- CCA CCA CCT CTC TTC CAG - 3'
pSLG1-3	5'- TAG CCA GAC GCC GTG ACC - 3'
pSLT2-5	5'- CTC AAC TGG GCT AGC GGC - 3'
pSLT2-3	5'- GGG CTT CTC AGT GAA TAC - 3'
"Reverse"	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG - 3'
SAC7-ATG	5'- GCG CGG ATCCGAATGCCAAATAATACTCTTAAAC - 3'
SAC7-5	5'- GTA TCG TTT GAG TCT ATC - 3'
SAC7-3	5'- GGC <u>GGA ATT CGA</u> AGA GTT ACA AGC TGT AAG - 3'
SLG1-5THS	5'- GGC <u>GGA ATT CAG</u> ACA CAT TAA TAT GAA GCG GG - 3'
SKM1-5	5'- CCC CGG TAC CGT AGT ATC GAA ACC TGC CGC - 3'
SKM1-3	5'- CCA CCA GGC ATT CCC TCT CC - 3'
SMP3-5	5'- CTT CTG CGA CAT GAA TAG GC - 3'
SMP3-3	5'- CCG <u>CAG ATC TCT</u> TTC CCT CAG GAA CCT CCA G - 3'
ST-PCR-2	5'- GGC CAC <u>GGA TCC</u> ACT TGT TGN NNN NNN NNN GAT AT - 3'
ST-PCR-4	5'- GGC CAC <u>GGA TCC</u> ACT TGT TG - 3'
TAT1-5	5'- CCG CAG ATC TGG TGG CAC CGC ACC TTC - 3'
TAT1-3	5'- GTG CTC ATC AAA GAA GTG GC - 3'
TAT2-5	5'- GGC CTG TAT GAT GCA AGT ATG - 3'
TAT2-3	5'- CGG CGC CCA CGC GAC GCG - 3'
Tn-114	5'- CGC CAG CTG GCG AAA GGG GG - 3'
TRP1eco	5'- GAC GCC AGA TGG CAG TAG TGG - 3'
TRP1nhe	5'- GCT GCC GGC GGT TGT TTG CAA G - 3'
U-47	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3'
U-200	5'- GGG AAG GGC GAT CGG TGC GGG - 3'
WSC3-5'	5'- GGT GAA ATG GCA ACA ATG G - 3'
WSC3-3'	5'- GAC ACT <u>AAA GCT TGG</u> AAG GTG G - 3'
YOR165-5	5'- GGT GTT GTG CAA GTA AGG - 3'
YOR165-3	5'- GCC AGA GGG AGA TGG AAG C - 3'
YOR322-5	5'- GGC <u>GGG TAC CGA</u> TGC TGA TGA GGA GCA AG - 3'
YOR322-3	5'- GCC ACA GGG AGA AGA TTT CG - 3'

Tabelle 2.9: Oligonukleotide zur Klonierung, PCR-Überprüfung oder Sequenzierung. Verwendete Restriktions-erkennungssequenzen sind unterstrichen und fett gedruckt.

2.1.4.2 Oligonukleotide zur Herstellung von Deletionen in *S.cerevisiae*

Name	Sequenz
delBAG7-5	5'- CTG GAC ATA TCT TAT TAC ACA ACA TAA AAT AGA ATG TTT AAC ATG AAT CTT CGT ACG CTG CAG GTC GAC - 3'
delBAG7-3	5'- CGC CGA ACC TCG GAA TCG ACT AGC AGA TCA CAG TGC TTA GGA AGC TAA GGC TGC GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G - 3'
delBEM2-5	5'- CAA AAA AAA CAA ATA ACG AAG CAG GAG TCT AAT GAA AGG TCT TCT CTG GTT CGT ACG CTG CAG GTC GAC - 3'
delBEM2-3	5'- GGA TTG TAT ACA TTT ACC ACG AAA ATT GTT TAT TGC TTG AAA TAA TCC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG - 3'
delROM2-5	5'- GGA CAA TTC ATC TCT TTT CCT GCG GTT ATG AGC GAA ACC AAC GTT GCT TCG TAC GCT GCA GGT CGA C - 3'
delROM2-3	5'- GGA AAG TCT ATA TAC GTT GCT ATC TTA ACC CCA GAA ATC TAA CGA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G - 3'
delSAC7-5	5'- GAT AAA CTA AAA ATA TCT TTA TAA TGC CAA ATA ATA CTC TTA AAC AAG GCC TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC - 3'
delSAC7-3	5'- GGA AAG AAA AAT GGT GTT ATC AAG CCC TGT TAG CAG AGC CTG AAC GGA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G - 3'
LRG1.5del	5'- GTA CCG GAG GTG AGC AAT GAT TCA AAA TTC TGC TGG TTA TCG ATC GCG TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC - 3'
LRG1.3del	5'- GAG GGG AAA CTT ACA GTT TCT GCC TAT TAT TTG TTT ATT TCA CCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G - 3'
ROM2mut-ubk1-5	5'- CAA ATT GCT GTA TTA GAA GAA TTC AAA TCA ATC ATA CTT TTA ATT GAT AAA AAT TAT ACA GTT GTC CGC TGT CAT TAA TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC - 3'
ScBCK1-d5	5'- ATG CCC TTT TTG AGG AAA ATA GCG GGG ACA GCA CAT ACA CAT TCT AGG TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC - 3'
ScBCK1-d3	5'- CTA TTC AGT TTT ATT CTC CTG AGA GGT TAT CCT TAA TTT TGA AGA GTT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G - 3'
SLG1d5	5'- GGA TAG TAC GTT GGC TGA TTT AGT ACT CAG GAT AAA AAA TTC TAT TTA AAT AAT GTT CGT ACG CTG CAG GTC GAC - 3'
SLG1d3	5'- GGA ACA AGA CTT GCT TGG CAA TAG TTT AAG AAT ATA ATA ATT TTT TTT GGG CAT AGG CCA CTA GTG GAT CTG - 3'
trp1-5	5'- GAG CAC GTG AGT ATA CGT GAT TAA GCA CAC AAA GGC AGC TTG GAG TCA GCT GAA GCT TCG TAC GC - 3'
trp1-3	5'- GCA GGC AAG TGC ACA AAC AAT ACT TAA ATA AAT ACT ACT CAG TAA TAA CGC ATA GGC CAC TAG TGG - 3'

Tabelle 2.10: Oligonukleotide zur Herstellung von Deletionen in *S.cerevisiae*2.1.4.3 Oligonukleotide zur Sequenzierung des *ROM2*-Gens

Name	Sequenz
ROM2-61	5'- GGT GTA GAA AGG AGG CCA GAT TCC - 3'
ROM2-1130c	5'- GCT AAT GAG GTG GAA GAA ACT CTC G - 3'
ROM2-1601	5'- CTT ATC CGA ATT CCG G - 3'
ROM2-2811	5'- GTT ATT TGC ATG TCC AGG - 3'

Tabelle 2.11: Oligonukleotide zur Sequenzierung des *ROM2*-Gens aus der *ubk1*-Mutanten

### 2.1.5 Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x PBS	0,58M NaHPO <sub>4</sub> , 0,17M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,68M NaCl
10x TBS	80g/l NaCl, 24,2g/l Tris/HCl, pH 7,6
20x SSC	3M NaCl, 0,3M Trinatriumsalz der Zitronensäure, pH 7,0 (mit HCl)

Tabelle 2.12: Zusammensetzungen hochkonzentrierter Puffer

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transformationen

#### 2.2.1.1 Transformation von *Escherichia coli*

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

#### 2.2.1.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von Plasmiden in *S.cerevisiae* wurde in Anlehnung an die Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1991) durchgeführt.

Zur Konstruktion von Deletionsstämmen und für Transformationen von Genbanken wurden die Zellen mittels der Lithiumacetat-Methode nach Gietz *et al.*, (1992) transformiert, da die Transformationseffizienz bei dieser Methode wesentlich höher liegt (bis zu 22 Millionen Transformanden/ $\mu$ g Plasmid-DNA).

### 2.2.2 Herstellung von *S.cerevisiae*-Deletionsstämmen

#### 2.2.2.1 Herstellung von Deletionsstämmen

Zur Deletion von Genen in *S.cerevisiae* wurde die "One-Step-Gene-Replacement"-Methode von Rothstein (1983) verwendet. Die Deletionskonstrukte wurden entweder als Disruptionsplasmide konstruiert oder über PCR in Anlehnung an die von Baudin *et al.* (1993) entwickelte Methode. Dabei wurden PCR-Produkte von den Plasmiden pUG6 (zur Deletion mit der *loxP-KanMX-loxP*-Kassette) oder pFA6aHIS3MX6 (zur Deletion mit dem *S.pombe his5<sup>+</sup>*-Gen) mit den unter 2.1.4.2 angegebenen Oligonukleotiden erzeugt. Zur Herstellung von Deletionsstämmen wurden Stämme mit 10-20 $\mu$ l PCR-Produkt (10-20 $\mu$ g DNA) mit der Lithiumacetat-Methode transformiert. Transformanden wurden nach einer 8-stündigen Regeneration in Vollmedium auf Geneticin-haltigem Vollmedium oder direkt auf Histidin-freiem Minimalmedium selektioniert. Die Überprüfung der korrekten Deletion erfolgte entweder über PCR-oder Southern-Analyse oder beides (siehe Ergebnisteil).

#### 2.2.2.2 Eliminierung der *KanMX*-Kassette

Zur Eliminierung der *KanMX*-Kassette wurde ein an Hefe angepaßtes, vom Cre-*loxP*-Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 abgeleitetes System verwendet (Güldener *et al.*, 1996). Hierbei vermittelt die Cre-Rekombinase die homologe Rekombination zwischen den die *KanMX*-Kassette flankierenden *loxP*-Erkennungssequenzen und das dazwischen liegende, die *KanMX*-Marke tragende Fragment wird entfernt.

Dazu wurde der entsprechende, das Kanamycin-Resistenzgen tragende Stamm mit dem Plasmid pSH47 transformiert und auf Uracil-Mangelmedium selektioniert. Je zwei Transformanden wurden über Nacht in Minimalmedium ohne Uracil mit 1% Glucose angezogen. Nach Verbrauch der Glucose wurde durch Zugabe von steriler Galaktose-

Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 2% die Transkription der Cre-Rekombinase induziert und über Nacht inkubiert. Um wieder einen Plasmid-freien Stamm zu erhalten, wurde aus der induzierten Kultur 1/1000 in frisches Vollmedium überführt und bis zur stationären Wachstumsphase angezogen. Aus dieser wurde wiederum frisches Vollmedium angeimpft. Die Anzucht in Vollmedium erfolgte über 4 Tage. Danach wurden Verdünnungsreihen auf YEPD-Medium plattiert und nach Wachstum auf Uracil-Mangelmedium plattiert, um Plasmid-freie Kolonien zu identifizieren. Diese wurden dann mittels PCR und Wachstumsanalyse auf den Verlust des *KanMX*-Gens überprüft.

### **2.2.3 Herstellung von diploiden *S.cerevisiae*-Stämmen**

#### **2.2.3.1 Herstellung von diploiden *S.cerevisiae*-Stämmen über Kreuzung**

Die miteinander zu kreuzenden Hefestämme wurden auf Vollmedium gegeneinander ausgestrichen und über Nacht bei 25°C oder 30°C inkubiert. Nach erfolgtem Wachstum wurden die Zellen auf Selektionsmedium, das nur diploiden Stämmen das Wachstum erlaubte, abgestempelt.

Falls die zu kreuzenden Stämme gleiche Selektionsmarker hatten, so daß die Selektion auf Diploide nicht möglich war, wurden gleiche Volumina einer logarithmisch-wachsenden Hefekultur miteinander gemischt, die Zellen 5min bei 3.000rpm abzentrifugiert und mindestens 6 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einem H<sub>2</sub>O-Agaroseplättchen (2,5%) ausgestrichen und Zygoten mittels eines Mikromanipulators (Bachhofer Typ 4086) isoliert.

#### **2.2.3.2 Herstellung von diploiden *S.cerevisiae*-Stämmen durch induzierten Paarungstyp-Wechsel**

Zur Herstellung von diploiden Stämmen mittels "Paarungstyp-Switch" wurde ein haploider Stamm mit dem Plasmid YCpHO transformiert und auf Uracil-freiem Medium selektioniert. Dieses Plasmid enthält das für die HO-Endonuklease kodierende Gen. Damit kommt es zum Paarungstypwechsel und anschließend zur Paarung. Um nach erfolgtem "Paarungstyp-Switch" wieder einen Plasmid-freien Stamm zu erhalten, wurden Transformanden in Vollmedium bis zur stationären Wachstumsphase angezogen. Aus dieser Kultur wurde mit 1/1000 frisches Vollmedium angeimpft und wieder bis zur stationären Wachstumsphase angezogen. Die Anzucht in Vollmedium erfolgte über 4 Tage. Dann wurden Verdünnungsreihen auf Vollmedium plattiert und nach Wachstum auf Uracil-Mangelmedium gestempelt, um Plasmid-freie Kolonien zu identifizieren. Anschließend wurden die Stämme sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen.

### **2.2.4 Sporulation, Tetradenpräparation und Paarungstyp-Analyse**

Diploide Zellen wurden zur Tetradenpräparation in 5ml YEED- oder Prä-Sporulationsmedium (10% Glucose, 0,8% Hefeextrakt, 0,3% Pepton) 1-2 Tage bei 30°C angezogen, 5min bei 3000rpm abzentrifugiert und auf 1%igen Kaliumacetat-Platten supplementiert mit den entsprechenden Aminosäuren und Basen zur Sporulation aufgetropft. Bei erfolgter Tetradenbildung (ca. 4-6 Tage bei Zimmertemperatur oder 30°C) wurden die sporulierten Zellen in 500µl 1M Sorbit suspendiert. Durch Zugabe von 5 µl Glucuronidase/Arylsulfatase (Roche, Mannheim) wurde dann 7-12 min die Ascuswand teilweise abgebaut. Die Trennung der einzelnen Sporen erfolgte mittels eines Mikromanipulators (Bachhofer Typ 4086) auf einem H<sub>2</sub>O-Agaroseplättchen (2,5%). Das Auskeimen der Sporen erfolgte dann auf Vollmedium (YEED oder YEED + 1M Sorbit) bei 25°C, 30°C oder 37°C. Zur Bestimmung des Paarungstyps der einzelnen Sporen wurden diese auf Vollmedium (YEED oder YEED + 1M Sorbit) gegen zwei Testerstämme (LD3R-7B [*MAT $\alpha$  leu1*], SMC-19A [*MAT $\alpha$  leu1*]) ausgestrichen. Nach Wachstum für 1 Tag bei 30°C wurden die Zellen auf SM-Platten (synthetisches Minimalmedium ohne Aminosäure-Zusätze) abgestempelt. Nur diploide Zellen können hier nach der Paarung wachsen

### **2.2.5 Erstellung serieller Verdünnungsreihen zur Wachstumsanalyse**

Zur Herstellung serieller Verdünnungsreihen wurden zu testende Stämme über Nacht bei 25°C oder 30°C in Vollmedium, das 1 M Sorbit enthielt, angezogen. Zellen wurden dann in Sorbit-haltigem Vollmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verdünnt und für weitere 4h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach entsprechenden Verdünnungen in sterilem, 1M Sorbit wurden zur Wachstumsanalyse Tropfen von 5µl aufgetropft, die dann 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen enthalten sollten. Die Temperatur und die Dauer der Inkubation der Platten ist dem Ergebnisteil zu entnehmen.

### **2.2.6 Identifizierung des Integrationsortes von Transposons**

#### **2.2.6.1 Isolierung von Transposon-flankierenden Sequenzen über Integration des Plasmides YIp5**

Um Sequenzen zu identifizieren, die ein ins Hefe-Genom integriertes Transposon flankieren, wurde zuerst der Vektor YIp5 durch homologe Rekombination in das Ampicillin-Resistenz-Gen des Transposons integriert (Abbildung 2.1). Nach Präparation von chromosomaler DNA verschiedener Transformanten, anschließender Restriktion mit *Nsi*I und Ligation wurde der Ansatz zur Plasmid-Amplifikation in *E.coli* transformiert. Hierbei sollten sich nur Plasmide amplifizieren lassen, die sowohl das Ampicillin-Resistenz-Gen, als auch den Replikationsursprung für die Amplifikation des Plasmids in *E.coli* enthalten. Im vorliegenden Fall (siehe 3.1.2.2) konnte ein Plasmid isoliert werden, pAL166, das nach Restriktionsanalysen die für YIp5 charakteristischen Banden enthielt.

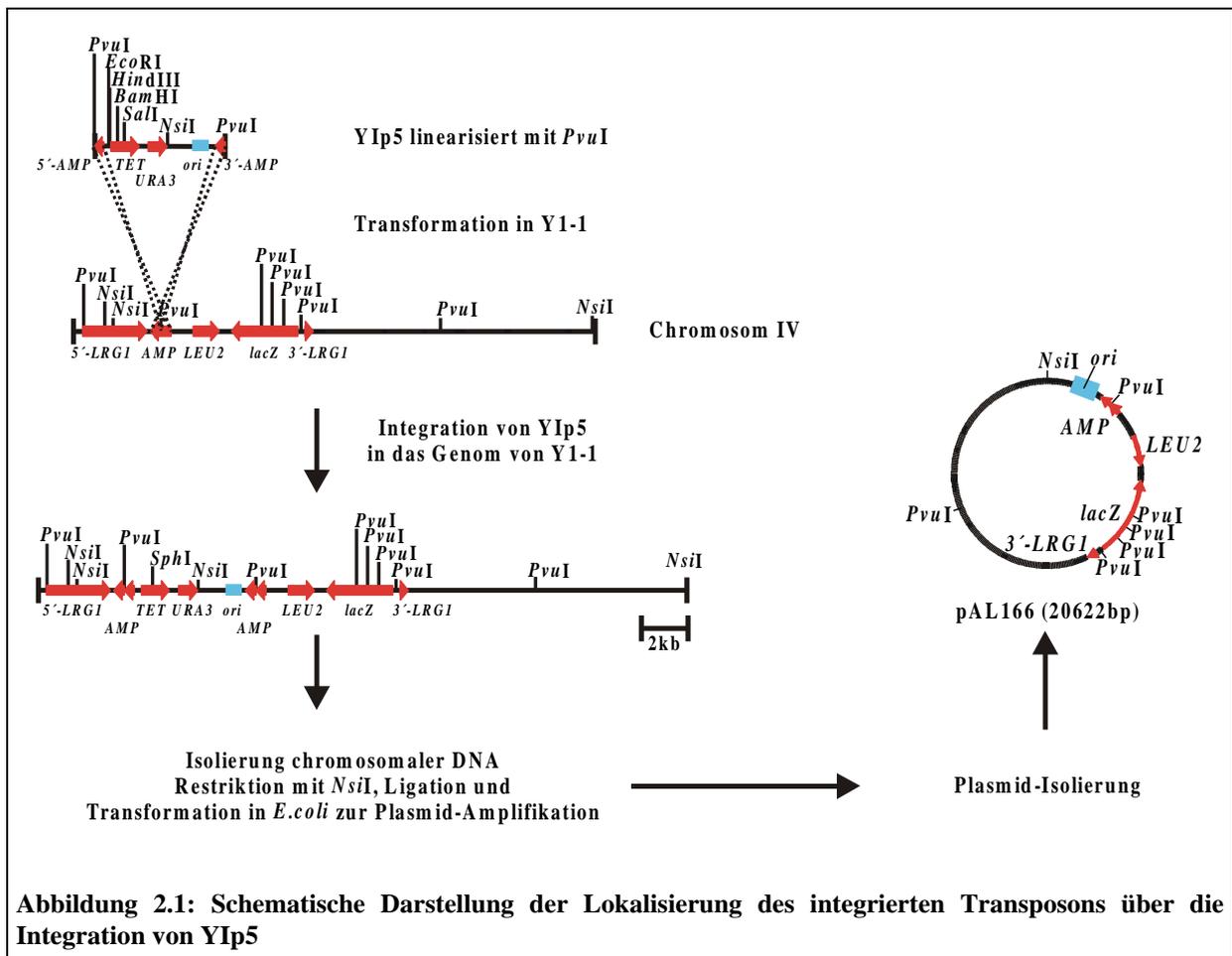
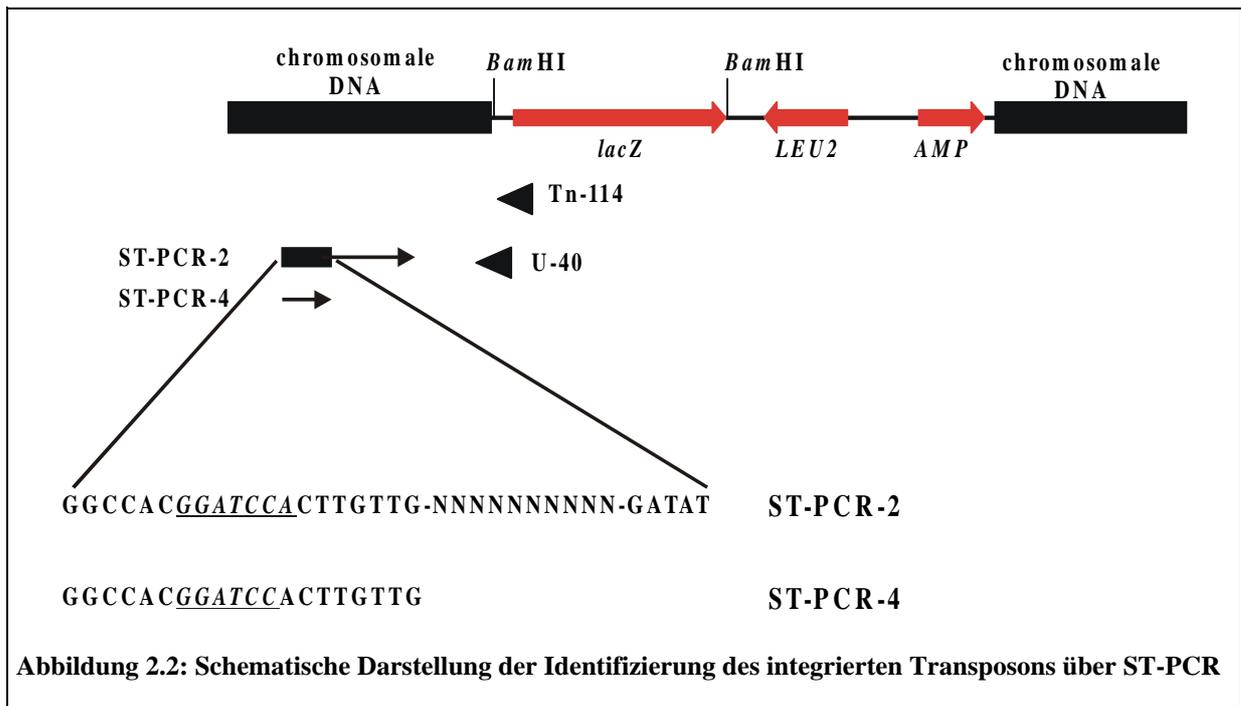


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Lokalisierung des integrierten Transposons über die Integration von YIp5

### 2.2.6.2 Isolierung von Transposon-flankierenden-Sequenzen über "Semi-Random"-PCR (ST-PCR)

Eine andere Methode zur Identifizierung von Transposon-flankierenden Bereichen ist die Methode der "Semi-Random, Two-Step"-PCR (ST-PCR) nach Chun *et al.* (1997). Diese Methode wurde in leicht abgewandelter Form angewendet. Sie setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen zusammen, die mit zwei Paaren Oligonukleotiden durchgeführt wird. In der ersten PCR wird ein Oligonukleotid verwendet, das spezifisch im Transposon bindet (Tn-114) und ein Oligonukleotid (ST-PCR-2), das 20 spezifische Basen enthält, denen sowohl ein Bereich von 10 zufällig gewählten Basen, als auch die Fünf-Basenpaar-Sequenz GATAT folgt, die statistisch alle 600bp im Hefe-Genom auftreten sollte. Bei der zweiten PCR bindet das eine Oligonukleotid (ST-PCR-4) an die 20bp-Sequenz des teilweise degenerierten Oligonukleotids, das andere (U-40) an eine Sequenz im Transposon, die in der ersten PCR amplifiziert wurde (Abbildung 2.2).



Die PCR erfolgte in 50µl Gesamt-Volumen. Für die Ansätze wurden 3mM MgCl<sub>2</sub>, eine dNTP-Konzentration von 250µM und eine Oligonukleotidkonzentration von 0,4 µM gewählt. Als "Template" diente in der ersten PCR 100 ng chromosomale DNA potentieller Mutanten-Stämme, während für die zweite PCR der 1. PCR-Ansatz 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt (1µl als "Template") eingesetzt wurde.

Für die PCR wurden die folgenden Programme verwendet:

**PCR 1:**

- 1.) 5min 96°C
- 2.) 5x 45sec 96°C  
1min 42°C (-1°C pro Zyklus)  
3min 68°C
- 3.) 25x 45sec 96°C  
1min 65°C  
3min 68°C
- 4.) bis Ende 4°C

**PCR 2:**

- 5min 96°C
- 29x 45sec 96°C  
1min 65°C  
3min 68°C
- bis Ende 4°C

Durch an den Oligonukleotiden vorhandene *Bam*HI-Schnittstellen konnte das PCR-Produkt der 2.PCR nach Reinigung direkt in den Vektor pUC19 kloniert werden.

## 2.2.7 Präparation von Nukleinsäuren

### 2.2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

#### 2.2.7.1.1 Plasmid-Isolierung aus *E.coli* über "Alkalische Lyse" ["Minipräparation"]

Die folgende Methode wurde nur für Plasmide durchgeführt, die für Restriktionsanalysen benötigt wurden. Die Isolierung erfolgte in Anlehnung an die "Alkalische Lyse"-Methode von Sambrook *et al.* (1989). Die Zellen einer 1,5ml Übernachtskultur wurden geerntet und in

300µl P1 (50mM Tris, 10mM EDTA, pH8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 300µl P2 (200mM NaOH, 1%SDS) und vorsichtigem Invertieren folgte die Zugabe von 300µl 3M Kaliumacetat-Lösung (pH5,5) und eine anschließende 15-minütige Zentrifugation bei 13.000rpm (Kühlzentrifuge Sigma 2K 15). Die in dem Überstand enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol und 15-minütige Zentrifugation bei 13.000rpm (Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) gefällt. Verbleibende RNA wurde durch 20-minütige Inkubation bei 37°C in 100µl RNase-Lösung (50mM Tris/HCl, pH8, 10mM EDTA, 0,1mg/ml RNase A, 150mM Natriumchlorid) entfernt. Die Zugabe von 5µl 3M Natriumacetat und 250µl 96% Ethanol fällt die Plasmid-DNA bei Zentrifugation (15min, 13.000rpm, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) aus. Die gefällte DNA wurde in 50µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.2.7.1.2 Plasmid-Isolierung aus *E.coli* mittels "High Pure Plasmid Isolation Kit"

Diese Methode zur Plasmid-Isolierung wurde verwendet, wenn Plasmide zur Sequenzierung vorgesehen waren, da hierfür sehr saubere DNA benötigt wurde. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim).

#### 2.2.7.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S.cerevisiae* (Robzyk und Kassir, 1992)

Zur Plasmid-Isolierung aus Hefe wurden Zellen einer 1,5ml stationären Hefekultur, die unter selektiven Bedingungen gewachsen waren, geerntet (5min, 5.000rpm, Zimmertemperatur, Eppendorf Microfuge) und dann in 100µl STET (8% Sucrose; 50mM Tris pH8; 50mM EDTA; 5% Triton X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2g Glasperlen (ø 0,45mm) wurden die Zellen 5min aufgeschlossen. Einer weiteren Zugabe von 100µl STET folgte ein 3minütiges Kochen bei 100°C. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10min, 4°C, 13.000rpm, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15). 100µl dieses Überstandes wurden mit 50µl einer 7,5M Ammoniumacetat-Lösung gemischt und anschließend wurden chromosomale DNA, große RNAs und andere Unreinheiten 1h bei -20°C präzipitiert. Dieses Gemisch wurde dann 10min zentrifugiert (4°C, 13.000rpm, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15), bevor 100µl des Überstandes mit 200µl kaltem, 96% Ethanol versetzt wurden. Die Plasmid-DNA wurde durch eine 15minütige Zentrifugation bei 13.000rpm pelletiert (Kühlzentrifuge Sigma 2K 15). Die Plasmid-DNA wurde dann in 20µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst. Um weitere Analysen mit der isolierten Plasmid-DNA durchführen zu können, bedurfte es einer Amplifikation des isolierten Plasmids. Dazu wurden 10µl von der erhaltenen Plasmid-DNA für eine *E.coli*-Transformation eingesetzt. Nach erneuter Minipräparation lag genügend DNA für die weitere Bearbeitung vor.

#### 2.2.7.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung chromosomaler DNA wurden Zellen aus 5ml Übernachtskultur geerntet und mit 1ml 1M steriler Sorbit-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden dann in 300µl Sphäroplasten-Puffer (50mM Natriumphosphat-Puffer, pH7,0, 0,9M Sorbit, 0,1M EDTA, 120µl/100ml β-Mercaptoethanol) resuspendiert und 10µl Zymolyase 100T (2,5mg/ml) zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 1h. Die Sphäroplastierung wurde dann mikroskopisch kontrolliert. Nach der Zugabe von 50µl EDTA und 50µl 10% SDS-Lösung wurden die Zellen dann für 30min bei 65°C, für 5 weitere Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurden dann Zelltrümmer und denaturiertes Protein 15min bei 13.000rpm abgetrennt. Der Überstand wurde nach Zugabe von 340µl Isopropanol 15min bei 13.000rpm gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden dann einer 30minütigen RNase-Behandlung bei 37°C in 100µl RNase-Lösung (50mM Tris/HCl, pH8, 10mM EDTA, 0,1mg/ml RNase A, 150mM NaCl) unterzogen. Nach Zugabe von 10µl 3M Natriumacetat und 250µl 96%igem Ethanol wurde die chromosomale DNA

dann durch 20minütige Zentrifugation bei 13.000rpm gefällt. Nach Trocknen des Pellets wurde dieses in 50µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> für mindestens 30min bei 37°C gelöst.

#### **2.2.7.4 Isolierung von Nukleinsäure-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Zur Isolierung spezifischer DNA-Fragmente nach einer Restriktion wurden die gewünschten Fragmente nach elektrophoretischer Trennung in einem 0,8-1%igen Agarose-Gel unter einer UV-Lampe ( $\lambda=312\text{nm}$ ) ausgeschnitten. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des "Prep-A- Gene<sup>®</sup> DNA Purification Kits" der Firma BIO-RAD (München) nach Anweisungen des Herstellers.

#### **2.2.7.5 Reinigung von PCR-Fragmenten**

Vor ihrem weiteren Gebrauch (z.B. für Klonierungen, als Sonde, u.s.w.) wurden PCR-Fragmente mit Hilfe des "High Pure PCR Product Purification Kit" nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) gereinigt.

#### **2.2.8 Restriktion von Nukleinsäuren**

Die sequenzspezifische Spaltung von Nukleinsäuren erfolgte nach Anweisungen des Herstellers der verwendeten Enzyme (siehe 2.1.1.3). Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden 4U/µg DNA (Inkubationszeit: 1-2h), für chromosomale DNA (5-10µg) wurden 10U Enzym (Inkubationszeit 14-16h) eingesetzt .

#### **2.2.9 Dephosphorylierung von Nukleinsäure-Fragmenten**

Bei der Dephosphorylierung wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen aus doppelsträngigen, linearen DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim) aus Kälberdarm (**CIP** = **c**alf **i**ntestine **p**hosphatase) nach Angaben des Herstellers entfernt. Zur Enzyminaktivierung wurde der Reaktionsansatz 15min bei 65°C inkubiert und anschließend über ein 1%iges Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem der gewünschte, linearisierte und dephosphorylierte Vektor isoliert werden konnte.

#### **2.2.10 DNA-Ligation**

Zur Ligation von DNA wurde ein 5 molarer Überschuß an Fragment-DNA mit Vektor-DNA 1-3h bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 16°C mit 1U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs Inc. (Frankfurt)) gemäß den Angaben des Herstellers ligiert.

#### **2.2.11 Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten mit Hilfe von Gelelektrophoresen**

##### **2.2.11.1 Auftrennung in nativen Agarose-Gelen**

Eine Größenanalyse von DNA-Fragmenten erfolgte über eine elektrophoretische Auftrennung in 0,8-2%igen Agarose-Gelen (Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst), je nach Größenbereich, der betrachtet werden sollte. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer (40mM Tris/HCl, 20mM Natriumacetat, 2mM EDTA, pH8,0). Als Längenstandard wurde DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  (geschnitten mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI/HindIII* oder *HindIII*) benutzt. Ein 15minütiges Färben der Agarose-Gele mittels einer Ethidiumbromid-Färbelösung (H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> mit 0,5µg/ml EtBr) machte die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda=366\text{nm}$ ) sichtbar.

##### **2.2.11.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gele zur Sequenzierung**

Die in Sequenzreaktionen gebildeten DNA-Fragmente wurden in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Zur Gelherstellung wurden die Lösungen des Systems "Sequagel-6" der Firma National Diagnostics (Hull, England) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elektrophorese erfolgte 2-8 h bei 50W (Einlauf der Proben: 40W) in einer Gibco BRL-Kammer mit 1x TBE-Puffer (90mM Tris pH8,0, 90mM Borsäure, 1mM EDTA)

als Laufpuffer. Nach vollendetem Gellauf wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und auf einem Whatman-Papier mindestens 2h bei 80°C auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Zur Autoradiographie wurde das getrocknete Gel direkt eingesetzt und ein Kodak X-OMAT™ Film verwendet. Je nach Menge der eingebauten <sup>35</sup>S-Nukleotide wurde die Expositionszeit zwischen 1-14 Tage variiert.

#### **2.2.12 Nicht-radioaktive Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin**

Die Markierung von Nukleinsäuren erfolgte nach dem von Feinberg und Vogelstein (1983) entwickelten Prinzip des "random priming". Dabei wurde der "DIG Luminescent Detection Kit" der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Die Markierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.13 DNA-DNA-Hybridisierung [„Southern-Blot“-Analyse] und Detektion**

Die elektrophoretische Auftrennung von der mit Restriktionsenzymen behandelten DNA (10µg) erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel. Nach beendetem Gellauf wurde das Gel 5min in 0,25M HCl-Lösung inkubiert, anschließend 2x15min in Denaturierungslösung (0,5M NaOH, 1,5M NaCl) und abschließend 2x15min in Transferpuffer (1M Ammoniumacetat). Anschließend wurde die DNA mittels eines Kapillarblots nach Southern (1975) auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) über Nacht übertragen. Die DNA wurde dann für 1-2h bei 80°C an die Membran fixiert. Die so behandelte Membran wurde für die Hybridisierung eingesetzt. Die Prähybridisierung der Membran erfolgte in Prähybridisierungslösung (5x SSC, 0,02% SDS, 0,1% D-Laurylsarcosin, 10% NRB2 (10g Blockierungsreagenz in 100ml NRB1 (100mM Maleinsäure, 150mM Natriumchlorid, pH 7,5) gelöst)) für mindestens 1h bei 64°C, wobei ein Volumen von 10ml/100cm<sup>2</sup> Membran eingesetzt wurde. Nach Zugabe der denaturierten, markierten Sonde erfolgte die Hybridisierung des Filters über Nacht bei gleicher Temperatur. Vor Beginn des Chemilumineszenz-Nachweises wurde die Membran erst 2x 5min mit 2x SSC mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur und 2x 15min in 0,1x SSC mit 0,1% SDS bei 64°C gewaschen.

Der Nachweis wurde mit Maleinsäure-Puffer nach dem modifizierten Detektionsprotokoll der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Dabei diente CSPD® (Tropix, Bedford, Massachusetts) in einer 1:200 Verdünnung als Chemilumineszenz-Substrat. Die Membran wurde dann auf Röntgenfilm (Fuji RX oder Kodak X-OMAT™) mit variierenden Zeiten exponiert.

#### **2.2.14 Radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Methode des Kettenabbruchs mit Hilfe des "Sequenase Version 2.0 Sequencing Kits" (USB/Bad Homburg) gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Als radioaktives Nukleotid wurde [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP eingesetzt. Oligonukleotide, die zur Sequenzierung verwendet wurden, sind unter 2.1.4.1 und 2.1.4.3 aufgelistet.

#### **2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion [PCR]**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mittels des "Expand High Fidelity PCR Systems" der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Bei PCR-Reaktionen, denen die Klonierung des amplifizierten Fragmentes folgen sollte, wurde der Reaktionsansatz in einem Volumen von 100µl durchgeführt, überschichtet mit 200µl Paraffinöl. Bei PCR-Reaktionen, die der Überprüfung von Deletionen diente, wurde ein Reaktionsvolumen von 50µl gewählt, das mit 100µl Paraffinöl überschichtet wurde.

Standardmäßig wurde eine MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 3mM, eine Oligonukleotid-Konzentration von 0,3 pmol/µl und eine dNTP-Konzentration von 250µM gewählt. Das

jeweilige PCR-Programm richtete sich nach dem zu amplifizierenden Fragment. Jedem Programm ging ein 5minütiger Denaturierungsschritt voraus, nachdem erst die "High fidelity"-Polymerase zugegeben wurde. Dann erst folgte die eigentliche PCR, die sich aus 25-35 Zyklen zusammensetzte. Zuerst erfolgte 45sec die Denaturierung bei 96°C, dann 2min, in Abhängigkeit von der Länge und Sequenz der Oligonukleotide, die Anlagerung der Oligonukleotide an die Ziel-DNA bei 55-60°C. Beim dritten Schritt wurde die Zeit der Verlängerung nach der zu erwartenden Fragmentgröße gewählt bei einer Temperatur von 68°C (1min/1kb zu synthetisierende DNA). Um zu gewährleisten, daß alle synthetisierten Stränge in ihrer Länge vollständig waren, wurde ein abschließender Verlängerungsschritt von 15min bei 68°C durchgeführt.

## **2.2.16 Analyse von Proteinen**

### **2.2.16.1 Herstellung von Hefe-Rohextrakten**

#### **2.2.16.1.1 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zur Bestimmung von $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten**

Um die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität von Zellen zu messen, die das Reporterkonstrukt pHPS100 trugen, wurden diese in 20 ml Sorbit-haltigem Selektionsmedium über Nacht bei 25°C angezogen. Dann wurden aus diesen Vorkulturen zweimal 50 ml Selektionsmedium (ohne Sorbit für die Inkubation bei 37°C zur Aktivierung und mit Sorbit für die Inkubation bei 25°C als Kontrolle) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,25 angeimpft. Diese Kulturen wurden dann für 7h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Zum Ernten wurden die Zellen in einer GPKR-Kühlzentrifuge (Beckman) 5min bei 2500rpm bei 4°C abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 50mM Kalium-Phosphat-Puffer wurden die Zellen in 100 $\mu$ l 50mM Kalium-Phosphat-Puffer mit gleichem Volumen Glasperlen [ $\varnothing$  = 0,45 - 0,5 mm] für 8min bei 4°C auf einem IKA-Vibrax-VXR aufgeschlossen. Dann wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Einmalreaktionsgefäß überführt, die Glasperlen zweimal mit je 100 $\mu$ l 50mM Kalium-Phosphat-Puffer gewaschen und mit dem ersten Überstand vereinigt. Zum Abtrennen von Zelltrümmern wurden die Überstände 10min bei 4°C bei 10.000rpm in einer Sigma 2K15 Zentrifuge abzentrifugiert. Die geklärten Überstände wurden dann in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

#### **2.2.16.1.2 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zum Nachweis des Mpk1-Proteins bzw. seiner phosphorylierten Form in *S.cerevisiae***

Hierzu wurde eine Methode in Anlehnung an Martín *et al.* (2000) durchgeführt. Die Zellen wurden über Nacht in Sorbit-haltigem Medium vorgezogen. Dann wurden 40ml Medium auf eine OD von 0,3 angeimpft. Zur Induktion des Weges wurden Zellen in Sorbit-freiem Medium für 4h bei 25°C angezogen, um danach für 2 h bei 37°C inkubiert zu werden. Nicht-induzierte Zellen wurden in Sorbit-haltigem Medium angezogen und für 6h bei 25°C inkubiert. Zum Ernten wurden die Zellen mit Eis gemischt und abzentrifugiert (5min, 2.500rpm, 4°C, Beckman GPKR Kühlzentrifuge). Anschließend wurden diese einmal mit 1ml eiskaltem, destilliertem Wasser gewaschen, um Mediumreste zu entfernen. Für den Aufschluß wurden die Zellen in 80 $\mu$ l Lysepuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10% Glycerin, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM Natriumorthovanadat, 50 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 5 mM Natriumpyrophosphat, 5 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und je 25  $\mu$ g/ml der Protease-Inhibitoren Tosylphenylalaninchloromethylketon, Tosyllysinchloromethylketon, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin A, Antipain und Aprotinin) resuspendiert, mit Glasperlen [ $\varnothing$  = 0,45 - 0,5 mm] versetzt und 8min bei 4°C auf dem IKA-

Vibrax-VXR aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Anschließend wurden die Glasperlen zweimal mit 60µl Lysepuffer gewaschen und alle Rohextrakte miteinander vereinigt. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch eine anschließende Zentrifugation (15min, 13.000rpm, 4°C, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Für die Western-Analyse wurde ein Teil des Rohextraktes sofort mit gleichem Volumen 2xProbenpuffer (25ml 4xSammelgelpuffer; 39ml 10%ige SDS-Lösung, 20ml Glycerin, 10ml β-Mercaptoethanol, 4mg Bromphenolblau, H<sub>2</sub>O ad 100ml; Laemmli, 1970) 10min bei 95°C gekocht, während der verbleibende Rest zur Proteinbestimmung nach Bradford (2.2.16.2.1) verwendet wurde.

#### 2.2.16.1.3 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zum Nachweis des überproduzierten KIMpk1-Proteins in *K.lactis* und in *S.cerevisiae*

Für Rohextrakte zum Nachweis des überproduzierten KIMpk1-Proteins in *K.lactis* und in *S.cerevisiae* wurden Transformanden in 20ml selektivem Minimalmedium mit 1M Sorbit 14h bei 30°C angezogen. Als Kohlenstoff-Quelle wurde 2% Galaktose zur Induktion des *GALI*-Promotors verwendet. Nach dem Ernten wurden die Zellen zweimal mit je 3ml 50mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH7,0) gewaschen, um dann in 100µl 50mM Kalium-Phosphat-Puffer mit gleichem Volumen Glasperlen [Ø = 0,45 - 0,5 mm] für 8min bei 4°C auf einem IKA-Vibrax-VXR aufgeschlossen zu werden. Dann wurde der Überstand in ein neues Eppendorf -Einmalreaktionsgefäß überführt und die Glasperlen zweimal mit je 100µl 50mM Kalium-Phosphat-Puffer gewaschen. Alle Überstände wurden vereinigt und durch Zentrifugation 10min bei 4°C bei 10.000rpm in einer Sigma 2K15 Zentrifuge geklärt. Überstände wurden dann in ein neues Gefäß überführt. Ein Teil dieses Rohextraktes wurde sofort mit gleichem Volumen Laemmli-Puffer 10min bei 95°C gekocht, während der andere Teil zur Proteinbestimmung nach Bradford (2.2.16.2.1) eingesetzt wurde.

#### 2.2.16.1.4 Herstellung von Hefe-Rohextrakten zum Nachweis der phosphorylierten Form des Mpk1-Proteins in *K.lactis*

Die Präparation des Rohextraktes zum Nachweis von phosphoryliertem KIMpk1-Protein erfolgte in Analogie zu der für *S.cerevisiae* verwendeten Vorschrift.

### 2.2.16.2 Bestimmungen von Proteinkonzentrationen

#### 2.2.16.2.1 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der Nachweis nach Bradford (1976) angewendet. Dazu diente der "Protein Assay" der Firma BIO-RAD (München), der nach Angaben des Herstellers eingesetzt wurde. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 595nm in einem Beckman DU 7400 Photometer. Als Standard wurde eine Eichkurve mit Rinderserum-Albumin (BSA) angefertigt.

### 2.2.16.2.2 Proteinbestimmung nach der Microbiuret-Methode

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Rohextrakten, die in Phosphatpuffer präpariert wurden, wurde diese Methode verwendet. 500µl Microbiuret-Lösung (40% NaOH, 1% CuSO<sub>4</sub>) wurde mit Rohextrakt, der auf 1ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> aufgefüllt wurde, gemischt. Die Messung dieser Proben erfolgte dann nach einer 10–60 minütigen Inkubationszeit bei 290nm in Quarzküvetten in einem Beckman DU 7400 Photometer. Zur Erstellung einer Eichkuve wurde auch hier Rinderserumalbumin verwendet.

### 2.2.16.3 Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten

#### 2.2.16.3.1 Qualitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität mittels "Overlay-Assay"

Um eine grobe Abschätzung der β-Galaktosidase-Aktivität machen zu können, wurde der sogenannte "Overlay-Assay" verwendet. Dazu wurden Zellen auf Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Zum Überschichten wurden 10ml 1% Agarose (in H<sub>2</sub>O gelöst) und 10ml 1M Natrium-Phosphat-Puffer, pH7,0 getrennt in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen der Lösungen auf etwa 50°C wurden diese gemischt und zusätzlich mit 50µl 10%iger SDS-Lösung und 400µl X-Gal-Lösung (5mg/ml in DMF gelöst) versetzt. Pro Platte wurden 10ml dieses Gemischs zum Überschichten verwendet. Die Platten wurden nach dem Überschichten noch für 30min - 5h (längstenfalls über Nacht) bei 30°C inkubiert.

#### 2.2.16.3.2 Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivität

Zur Bestimmung von β-Galaktosidase-Aktivitäten in Rohextrakten (Herstellung siehe 2.2.16.1.1) wurde je 950µl vorgewärmter lacZ-Puffer (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 1mg/ml ONPG, pH7,0) mit 50µl Rohextrakt bei 30°C bis zur Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 500µl 1M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt (Extinktion sollte 1,0 nicht überschreiten). Die Proben wurden dann bei 420nm in einem Ultrospec 4000/UV/Visible Spectrophotometer der Firma Pharmacia Biotech gemessen.

Die spezifische Aktivität wurde mit der folgenden Formel ermittelt:

$$\text{Spezifische Aktivität [U/mg Protein]} = \frac{\Delta E / \text{min} * V_{\text{ges}}}{\epsilon * m_{\text{Protein}} * V_{\text{RE}} * d}$$

Δ E/min : Extinktionsänderung pro Minute

ε : Extinktionskoeffizient (für 2-Nitrophenol: ε = 4,5 x 10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)

V<sub>ges</sub> : Gesamtvolumen des Testansatzes in der Küvette (in 1500µl)

V<sub>RE</sub> : Volumen des eingesetzten Rohextraktes (in µl)

d : Schichtdicke der Küvette (1cm)

m<sub>Prot</sub> : Proteinkonzentration des Rohextraktes (mg/ml)

### 2.2.16.4 Aufreinigung von GST-Rho1p mittels Glutathion-Sepharose

#### 2.2.16.4.1 Herstellung von Rohextrakten

Für den ersten Rohextrakt wurden Zellen des Stammes HD56-5A, transformiert mit dem Plasmid pHPS106, in 50ml Glucose-haltigem Minimalmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2 gezogen, einmal mit 20ml H<sub>2</sub>O gewaschen und bis zum Aufschluß bei -20°C gelagert. Zellen wurden in 500µl Aufschlußpuffer (1x PBS, pH7,5, 40µM GTP-γ-S, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, je 10 µg/ml der Protease-Inhibitoren Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin A, Antipain und Aprotinin) resuspendiert und mit gleichem Volumen Glasperlen [Ø = 0,45 - 0,5 mm] versetzt. Der Aufschluß erfolgte 8min bei 4°C auf einem IKA-Vibrax-VXR. Der Überstand wurde dann durch Zentrifugation 15min bei 13.000rpm bei 4°C geklärt.

Für den zweiten Rohextrakt wurden Zellen des Stammes HD56-5A, transformiert mit dem Plasmid pAL183, in 50µl Minimalmedium mit 2% Glucose bis zum Verbrauch der Glucose über Nacht angezogen. Dann erfolgte die Zugabe von steriler Galaktose-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 2% zur Induktion des *GAL1*-Promotors. Zellen wurden 6h bei 30°C induziert und dann geerntet. Nach einem Waschschrift mit 20ml eiskalten sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> wurden Zellen bis zum Aufschluß bei -20°C gelagert. Diese Zellen wurden in 500µl eiskaltem Lyse-Puffer (50mM Tris/HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 0,2mM Natriumorthovanadat, 50mM Kaliumfluorid, 30mM Natriumpyrophosphat, 1% Nonidet P-40, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und je 25 µg/ml der Protease-Inhibitoren Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin A, Antipain und Aprotinin) resuspendiert und nach Zugabe eines gleichen Volumens Glasperlen [Ø = 0,45 - 0,5 mm] für 8min bei 4°C auf einem IKA-Vibrax-VXR aufgeschlossen. Auch hier wurde der Rohextrakt durch eine 15minütige Zentrifugation bei 4°C und 13.000rpm geklärt.

#### 2.2.16.4.2 Gemeinsame Aufreinigung von GST-Rho1p und Lrg1p-13myc

300µl des ersten Rohextraktes wurden mit 50µl 1x PBS-äquibrierter Glutathion-Sepharose versetzt und 1h auf einer "Wippe" bei 4°C inkubiert, um eine Bindung des GST-Fusionsproteins an die Matrix zu erlauben. Nach Abzentrifugation wurde der Überstand 1:1 mit 2x Probenpuffer gekocht und als "Durchfluß" (FT1) bezeichnet. Die Matrix wurde dann 3mal mit 500µl 1x PBS-Puffer gewaschen, wobei diese Waschfraktionen mit W1, W2, und W3 bezeichnet wurden. Auch diese wurden 1:1 mit 2x Probenpuffer gekocht. Dann erfolgte die Zugabe von 300µl des zweiten Rohextraktes zur Matrix mit dem gebundenen GST-Rho1-Protein. Diese Inkubation erfolgte 5h bei 4°C auf der "Wippe". Dann wurde die Matrix abzentrifugiert und der Überstand 1:1 mit 2x Probenpuffer gekocht. Diese Fraktion wurde auch als Durchfluß bezeichnet (FT2). Dann wurde die Matrix dreimal mit 500µl IP-Waschpuffer (50mM Tris/HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 0,2mM Natriumorthovanadat, 30mM Natriumpyrophosphat, 1% Nonidet P-40) gewaschen. Diese wurden auch als Waschfraktionen (W4, W5, W6) bezeichnet. Um gebundenes Protein zu eluieren, wurde die Matrix dreimal mit je 50µl Elutionspuffer (50mM Tris/HCl, pH8,0, 10mM reduziertes Glutathion) inkubiert und der Überstand abgenommen. Dann wurden alle drei Elutionsfraktionen vereinigt, 1:1 mit 2x Probenpuffer gekocht und als Elutionsfraktion (E) bezeichnet.

### 2.2.16.5 Ko-Immünpräzipitation des Lrg1-Proteins mit dem Rho1-Protein

Die Ko-Immünpräzipitation von Lrg1p und Rho1p wurde in Analogie zur Anleitung der Ko-Immünpräzipitation von Rho1p mit Pkc1p von Kamada *et al.* (1996) durchgeführt. Zellen des Stammes HD56-5A transformiert mit den Plasmiden pHPS106 und pAL183 wurden in 50ml Kultur angezogen, geerntet und einmal mit 5ml eiskalter Stop-Lösung (0,9% NaCl, 1mM

NaN<sub>3</sub>, 10mM EDTA, 50mM NaF) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 400µl eiskaltem Lyse-Puffer (50mM Tris/HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 0,2mM Natriumorthovanadat, 50mM Kaliumfluorid, 30mM Natriumpyrophosphat, 1% Nonidet P-40, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid und je 25µg/ml der Protease-Inhibitoren Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin A, Antipain und Aprotinin) suspendiert. Nach Zugabe eines gleichen Volumen Glasperlen [Ø = 0,45 - 0,5 mm] und 2µl Antifoam A erfolgte der Zellaufschluß für 8min bei 4°C auf einem IKA-Vibrax-VXR. Der Überstand wurde abgenommen und durch Zentrifugation für 3x 10min bei 13.000 bei 4°C geklärt. Rohextrakt mit einem Gesamtprotein von 700µg wurde mit Immunpräzipitationspuffer (50mM Tris/HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 0,2mM Natriumorthovanadat, 50mM Kaliumfluorid, 30mM Natriumpyrophosphat, 15mM p-Nitrophenylphosphat, 1% Nonidet P-40) auf 500µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 20µl 50%iger Protein-A-Sepharose erfolgte eine einstündige Inkubation bei 4°C auf einer "Wippe", die der Verminderung unspezifischer Bindungen von Proteinen an die ProteinA-Sepharose dienen sollte. Nach Entfernung der zugegebenen ProteinA-Sepharose durch Zentrifugation wurden diesem Extrakt 2µl Anti-c-myc-Antikörper zugesetzt und für eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Um das Präzipitat aus Lrg1-13-Myc und anti-c-myc auszufällen, wurde wieder 20µl 50%ige ProteinA-Sepharose zugegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Dieses Gemisch wurde abzentrifugiert, und 4mal mit je 500µl Wasch-Puffer (50mM Tris/HCl, pH7,5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 0,2mM Natriumorthovanadat, 1% Nonidet P-40) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose in 1x Probenpuffer gekocht.

### **2.2.16.6 Nachweis spezifischer Proteine durch Westernblot-Analyse**

#### 2.2.16.6.1 Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (1970). Dazu wurden 3%ige Sammelgele (Sammelgelpuffer: 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,1% SDS) und 7,5%ige Trenngele (Trenngelpuffer: 0,375 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1% SDS) verwendet. Nach vollendetem Gellauf wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel mindestens 30min in Transfer-Puffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol) äquilibriert.

#### 2.2.16.6.2 Transfer von Proteinen auf Membranen

Der Transfer der Proteine erfolgte in einer "Tankblot-Apparatur" auf eine Membran (Protan BA Nitrocellulose-Membran (zum Nachweis von Mpk1p und phosphoryliertem Mpk1p) oder Immobilon P-Membran (zum Nachweis aller anderen Proteine), die gemäß den Angaben des Herstellers vorbehandelt wurde. Die Übertragung wurde in Transfer-Puffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol) 4h bei 4°C bei 55V oder über Nacht bei 4°C bei 40V durchgeführt.

#### 2.2.16.6.3 Nachweis von phosphoryliertem Mpk1-Protein von *S.cerevisiae*

Nach dem Transfer wurde die Membran dreimal 10 min mit TBST (50 mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20) gewaschen, um mögliche Methanol-Reste des Transfer-Puffers zu entfernen. Es folgte eine einstündige Inkubation der Membran in Blockierungs-Lösung (TBST + 5% Magermilchpulver) unter Schütteln bei Zimmertemperatur. Der Erstantikörper (Phospho-spezifischer p44/42-MAP-Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper) wurde 1:2000 in TBST mit 1% Magermilchpulver verdünnt und für 1,5h bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann erfolgten 8 fünfminütige Waschschriffe mit TBST. Der Zweitantikörper (POD-

gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper) wurde 1:50.000 in TBST mit 1% Magermilchpulver verdünnt und die Membran darin für 1h bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann erfolgten 8 fünfminütige Waschschrte der Membran in TBST. Nach Einschweißen der Membran mit 2 ml Chemilumineszenzsubstrat (Pierce) wurde die Membran auf Röntgenfilm (Fuji RX) exponiert.

#### 2.2.16.6.4 Nachweis von phosphoryliertem Mpk1-Protein von *K.lactis*

Die Entwicklung zum Nachweis von phosphoryliertem *K.lactis*-Mpk1-Protein erfolgte in Analogie zum Nachweis des *S.cerevisiae* phosphorylierten Mpk1-Proteins. Lediglich die Antikörper-Verdünnungen wurden variiert. So wurde der Erstantikörper 1:2000 in TBST + 1% Magermilchpulver verdünnt, während der Zweitantikörper in einer 1:10.000-Verdünnung eingesetzt wurde.

#### 2.2.16.6.5 Nachweis des Mpk1-Proteins von *S.cerevisiae*

Hierzu wurde die Membran 1h in Blockierungs-Lösung (TBST + 5% Magermilchpulver) unter Schütteln bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Erstantikörper (yN-19) wurde 1:200 in TBST + 1% Magermilchpulver verdünnt und für 1,5h bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann folgten 8 fünfminütige Waschschrte mit TBST. Der Zweitantikörper (POD-gekoppelter anti-Ziege-Antikörper) wurde 1:25.000 in TBST + 1% Magermilchpulver verdünnt und die Membran darin für 1h bei Zimmertemperatur inkubiert. Wieder wurde die Membran 8mal 5min in TBST gewaschen, um dann mit 2 ml Chemilumineszenzsubstrat in einer Tüte eingeschweißt zu werden. Zur Exposition wurde Röntgenfilm (Fuji RX) verwendet.

#### 2.2.16.6.6 Nachweis des Mpk1-Proteins von *K.lactis*

Der Nachweis des Mpk1-Proteins aus *K.lactis* wurde in Anlehnung an den Nachweis des Mpk1-Protein aus *S.cerevisiae* durchgeführt. Auch hier wurden nur die Antikörper-Verdünnungen variiert. Der Erstantikörper wurde in einer 1:100-Verdünnung, der Zweitantikörper in einer 1:10.000 Verdünnung eingesetzt.

#### 2.2.16.6.7 Nachweis des GST-Rho1-Fusionsproteins

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde diese 1h in PBSTB (1x PBS, 0,05% Tween-20 + 3% BSA) bei Zimmertemperatur unter Schütteln blockiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Dann wurde die Membran für 1,5h in Antikörperlösung (1:1.000 Erstantikörper (siehe 2.1.1.4) in PBST + 3% BSA verdünnt) inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper erfolgten zwei Waschschrte mit PBST (1x PBS, 0,05% Tween-20) und ein dritter Waschschrte mit PBST + 3% BSA. Der zweite Antikörper wurde 1:5.000 in PBST + 3% BSA verdünnt und die Membran darin für 1,5h bei Zimmertemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden wieder durch zwei Waschschrte in PBST und einen Waschschrte in PBST + 3% BSA entfernt. Dann wurde die Membran 2 min in NRB3-Puffer (100mM Tris/HCl, pH9,5; 100mM NaCl; 50mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Zur Entwicklung wurde die Membran dann in 50ml NRB3-Puffer mit 7mg BCIP und 50mg NBT (gelöst in 500µl DMF) bis zur gewünschten Färbung inkubiert. Durch anschließende Inkubation der Membran in 50mM Tris, pH7,0 wurde die Farbreaktion beendet. Nach einem weiteren Waschen der Membran in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> wurde diese getrocknet.

#### 2.2.16.6.8 Nachweis des Lrg1-13myc-Fusionsproteins

Der Nachweis des Lrg1-13myc-Fusionsproteins erfolgte in Analogie zum Nachweis des Rho1-GST-Fusionsproteins. Es wurden lediglich andere Antikörper (siehe 2.1.1.4) in einer anderen Verdünnung verwendet. So wurde der erste Antikörper 1:5.000 in PBST + 3% BSA verdünnt, während der zweite Antikörper in einer 1:5.000 Verdünnung eingesetzt wurde.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktions-Weg in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.1.1 Charakterisierung des Mutanten-Stammes Y1

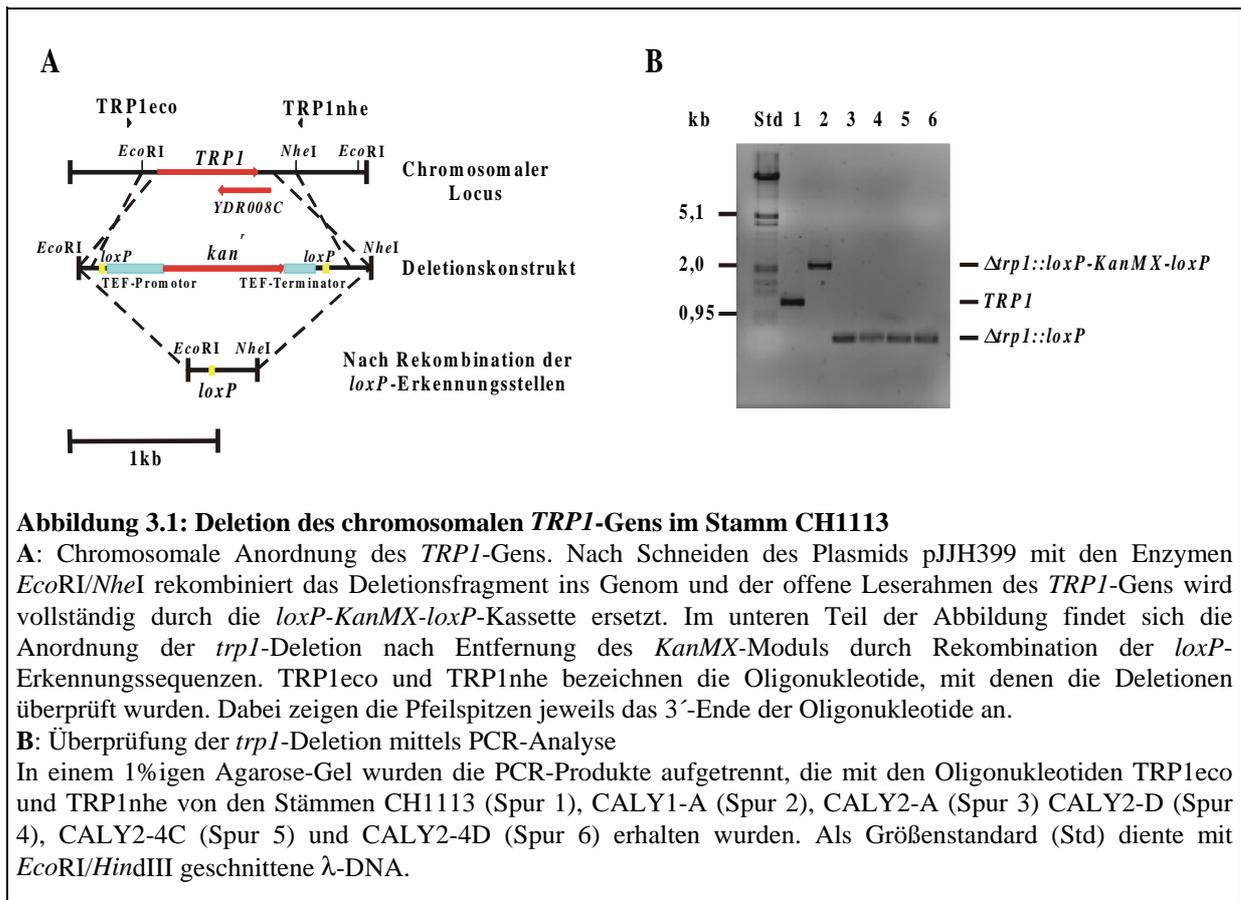
In Vorarbeiten konnte bei der Suche nach Komponenten, die oberhalb von Bck1p wirken, eine Mutante nach UV-Mutagenese isoliert werden, die die für Pkc1p-Weg-Mutanten typischen Defekte, wie Koffeinsensitivität und Erfordernis, osmotisch stabilisiert zu werden, zeigt (Jacoby, 1997). Dieser Mutanten-Stamm wurde mit Y1, das mutierte, unbekannte Gen, dessen Defekt rezessiv ist, mit *ubk1* (upstream of Bck1p) bezeichnet. Bei dem gesuchten *ubk1*-Gen sollte es sich aufgrund der Isolierungsmethode um ein Gen handeln, das für ein oberhalb der MAP-Kinase-Kinase-Kinase Bck1p agierendes Protein kodiert (Jacoby, 1997).

Bei dem Versuch der Identifizierung des mutierten Gens wurden bisher nur zahlreiche Suppressoren isoliert. So wurden die Gene *ROM1* und *ROM2* als Hochkopienzahl-Suppressoren, die Gene *SLG1*, *MID2*, *PKC1* und *RHO1* als schwache Niedrigkopienzahl-Suppressoren identifiziert (Jacoby, 1997; Nilius, 1997).

Im folgenden Teil der Arbeit sollte der Mutanten-Stamm Y1 näher charakterisiert und andere Ansätze zur Identifizierung des mutierten Gens entwickelt werden, mit dem Ziel, das *UBK1*-Gen zu isolieren.

##### 3.1.1.1 Herstellung eines Tryptophan-bedürftigen Stammes

Um die Mutante Y1 besser charakterisieren zu können, wurde zunächst ein *trp1*-Marker in den Stamm eingebracht. Dies sollte die Selektion von auf *TRP1*-basierenden Plasmiden und Genbanken ermöglichen. Dazu wurde zunächst der Stamm CALY1-A konstruiert. Bei diesem Stamm handelt es sich um den Wildtyp-Stamm CH1113, bei dem der ganze offene Leserahmen des *TRP1*-Gens durch eine *loxP-KanMX-loxP*-Kassette ersetzt wurde (Abbildung 3.1A). Dazu wurde das Plasmid pJJH399 mit den Enzymen *EcoRI/NheI* geschnitten und in den haploiden Stamm CH1113 transformiert. Resultierende Transformanden wurden durch Ausstrich auf ihre Tryptophan-Bedürftigkeit getestet und mittels PCR überprüft. Um in diesem Stamm die Selektion auf weitere *KanMX*-Deletionskassetten oder entsprechende Vektoren zu erlauben, wurde der Marker, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, regeneriert. Der entsprechende Stamm wurde mit CALY2-A bezeichnet. Weiterhin wurde auch der diploide Stamm CALY2-D, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, erzeugt. Die Sporulation dieses Stammes brachte die Stämme CALY2-4C und CALY2-4D hervor. Die korrekte Deletion des *TRP1*-Gens aller Stämme wurde mithilfe einer PCR-Analyse überprüft und ist in Abbildung 3.1B gezeigt.



### 3.1.1.2 Rückkreuzung und Einbringen des $\Delta trp1$ -Locus in den Y1-Stamm

Da die Y1-Mutante aus einer UV-Mutagenese hervorgegangen war, war es nötig, diese gegen den Ausgangsstamm rückzukreuzen. Hierdurch sollte gewährleistet werden, daß die Y1-Mutante wirklich nur ein defektes Gen trägt, aber auch, daß mögliche Mutationen, die durch die UV-Mutagenese im Stammhintergrund entstanden sein könnten, durch Kreuzung eliminiert werden. Hierzu wurde der Stamm Y1 durch Transformation mit einem HO-Gen tragenden Plasmid diploidisiert (siehe 2.2.3.2). Es entstand der Stamm CALY10-D. Dieser wurde sporuliert und eine seiner Koffein-sensitiven Segreganten, CALY10-3B, mit dem Stamm CALY2-A gekreuzt, um die *trp1*-Marke einzubringen. Der diploide Stamm CALY11-D wurde sporuliert. Die Tetraden-Analyse zeigte, daß es sich bei der *ubk1*-Mutation um nur ein defektes Gen handeln mußte, da der Zelllysedefekt und die Koffein-Sensitivität zusammen und 2:2 mit dem Wildtyp-Phänotyp segregierten. Ähnliches wurde auch schon von Jacoby (1997) beobachtet. Nach Sporulation wurde mit der Koffein-sensitiven, Tryptophan-bedürftigen Spore CALY11-3C weitergearbeitet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden außerdem die Segreganten CALY11-3A, CALY11-7A und CALY11-7C verwendet.

### 3.1.1.3 Komplementationstest verschiedener Gene in der *ubk1*-Mutanten

Aufgrund des Phänotyps der *ubk1*-Mutanten wurden verschiedene Gene auf Komplementation getestet, deren Produkte Funktionen oberhalb von Bck1p ausüben und bisher noch nicht untersucht waren, wie das *TOR2*-Gen und das *WSC3*-Gen. Außerdem wurden verschiedene Gene (*SKM1*, *YOR165w*, *SPP2*, *SPM3* und *YOR322c*) aufgrund der unter 3.1.1.4 folgenden Kreuzungsanalyse getestet, bei denen sich nach ersten Versuchen eine

Kopplung andeutete und ein möglicher Zusammenhang zur Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion gegeben war. Alle Gene wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die *ubk1*-Mutante zu komplementieren (Tabelle 3.1).

Gen	Funktion des Genproduktes	Chr.	Plasmid	Referenz	Komplementation
<i>TOR2</i>	Phosphatidylinositol-Kinase-Homologes; Zellwachstum und Sensitivität gegen Rapamycin	XI	pJK4	Schmidt <i>et al.</i> , (1997)	■
<i>WSC3</i>	möglicher Oberflächensensor zur Erhaltung der Zellwandintegrität und zur Antwort auf Stress	XV	pAL144	Verna <i>et al.</i> , (1997)	■
<i>TAT2</i>	hoch-affine Tryptophan-Permease	XV	pAL156/ pAL158	Schmidt <i>et al.</i> , (1994); Schmidt <i>et al.</i> , (1998)	■
<i>TAT1</i>	homologes Gen zu <i>TAT2</i> ; Aminosäure-Permease, die Valin, Leucin, Isoleucin, Tyrosin und Tryptophan transportiert	II	pAL160/ pAL162	Schmidt <i>et al.</i> , (1994); Schmidt <i>et al.</i> , (1998)	■
<i>SKM1</i>	Serin/Threonin-Proteinkinase mit Ähnlichkeit zu Ste20p und Cla4p	XV	pAL164-A; -B; -C/ pAL165-A; -B; -C	Martín <i>et al.</i> , (1997)	■
<i>YOR165w</i>	unbekannte Funktion, zwei GTP-Binde-Motive; im C-Terminus Ähnlichkeit zu menschlichen GBP1, einem Interferon-induzierten GTP-bindenden Protein	XV	pAL167-A; -B; -C	Madania <i>et al.</i> , (1996); Wang <i>et al.</i> , (1997)	■
<i>SPP2</i>	Protein, das an der Prä-mRNA-Prozessierung beteiligt ist	XV	pAL168-A; -B; -C	(Last <i>et al.</i> , 1987)	■
<i>SMP3</i>	Protein, das für Plasmid-Erhaltung nötig ist und möglicherweise im Pkc1p-Weg agiert	XV	pAL169-A; -B; -C	Irie <i>et al.</i> (1991a) Irie <i>et al.</i> , (1991b)	■
<i>YOR322C</i>	Protein mit unbekannter Funktion; Deletion zeigt Koffein- und Osmosensitivität	XV	pAL222 hin-A; -B; -C pAL223 hin-A; -B; -C	Pearson <i>et al.</i> , (1998)	■

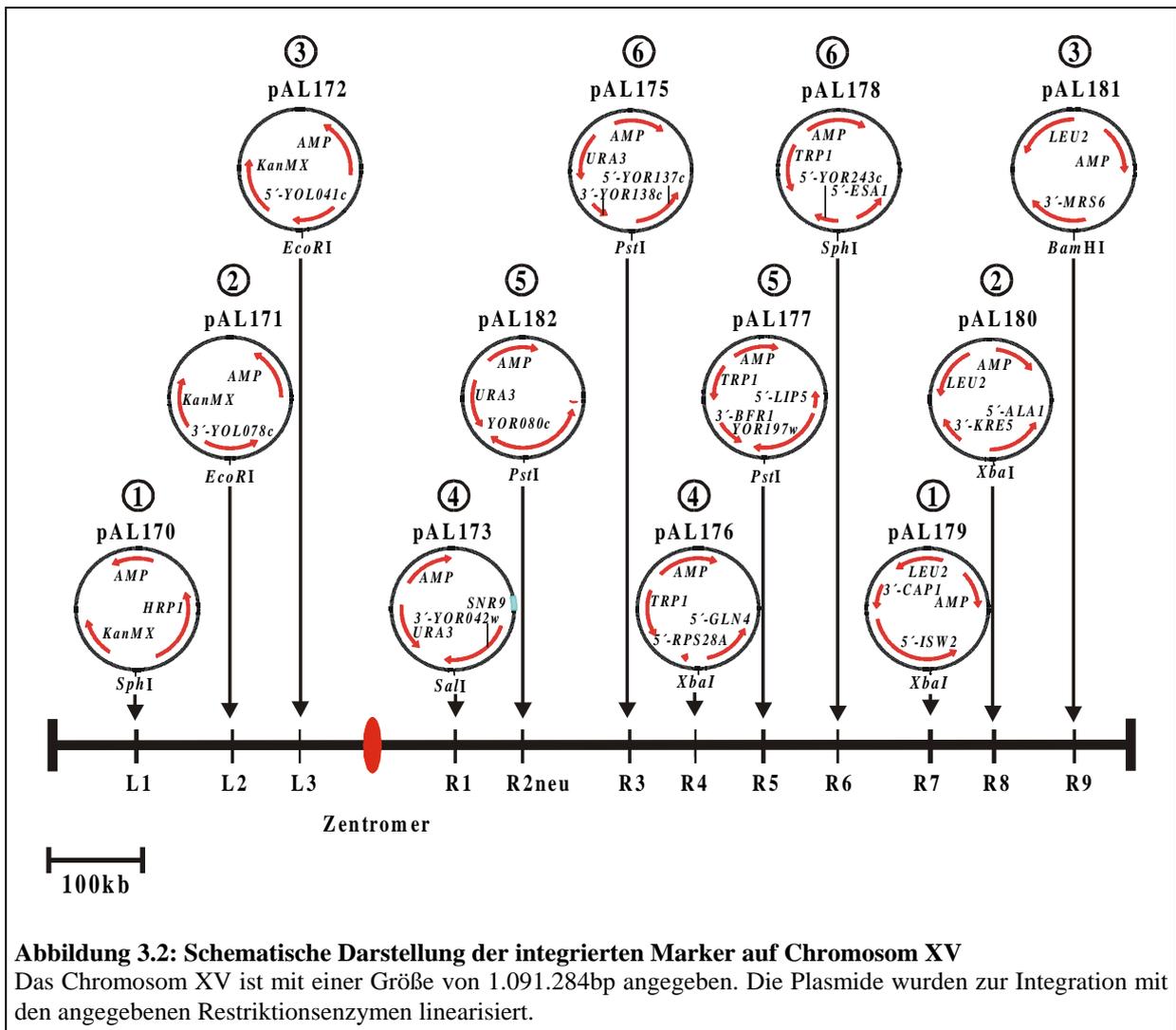
**Tabelle 3.1: Zusammenfassung von Komplementationstests der *ubk1*-Mutanten (CALY11-7C)**

Es zeigte sich, daß keines der getesteten Gene in der Lage war, die *ubk1*-Mutante zu komplementieren.

#### 3.1.1.4 Versuch der Kartierung des mutierten *ubk1*-Gens durch Kreuzungsanalysen

In Vorversuchen bei der Kreuzung der *ubk1*-Mutanten gegen Kartierungsstämme deutete sich an, daß die gesuchte *ubk1*-Mutation auf Chromosom XV liegen sollte (J.Heinisch; persönliche Mitteilung). Um die Mutation auf Chromosom XV kartieren zu können, sollten ca. alle 80 - 100kb "Marker-Gene" integriert werden. Eine anschließende Tetraden-Analyse sollte dann zeigen, mit welchem der integrierten "Marker-Gene" das *ubk1*-Gen gekoppelt weitergegeben

wird. Es sollten die Marken *TRP1*, *URA3*, *LEU2* und *KanMX* verwendet werden. Hierzu wurden integrative Plasmide konstruiert, die verschiedene, durch PCR-amplifizierte Fragmente des Chromosoms XV enthielten (Abbildung 3.2). Die Fragmente wurden so gewählt, daß die Integration keine Disruption eines Gens zur Folge hat.



Die in Abbildung 3.2 mit ①, ②, ③ gekennzeichneten Plasmide wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert und jeweils zusammen in den Stamm CALY2-A (Wt,  $\Delta trp1$ ) integriert. Die mit ④, ⑤, und ⑥ gekennzeichneten Plasmide wurden in den Stamm CALY11-3C (*ubk1*,  $\Delta trp1$ ) integriert. Im weiteren Verlauf wurden die Stämme, die ① integriert hatten mit ④, ② mit ⑤ und ③ mit ⑥ miteinander gekreuzt und die entstandenen Tetradentypen analysiert (siehe Tabelle 3.2). Nach ersten Analysen wurden für Kreuzungen, bei denen zunächst keine eindeutige Aussage über Kopplung gemacht werden konnte, noch mehr Tetraden analysiert, was sich durch die unterschiedlichen Gesamtzahlen an betrachteten Tetraden widerspiegelt.

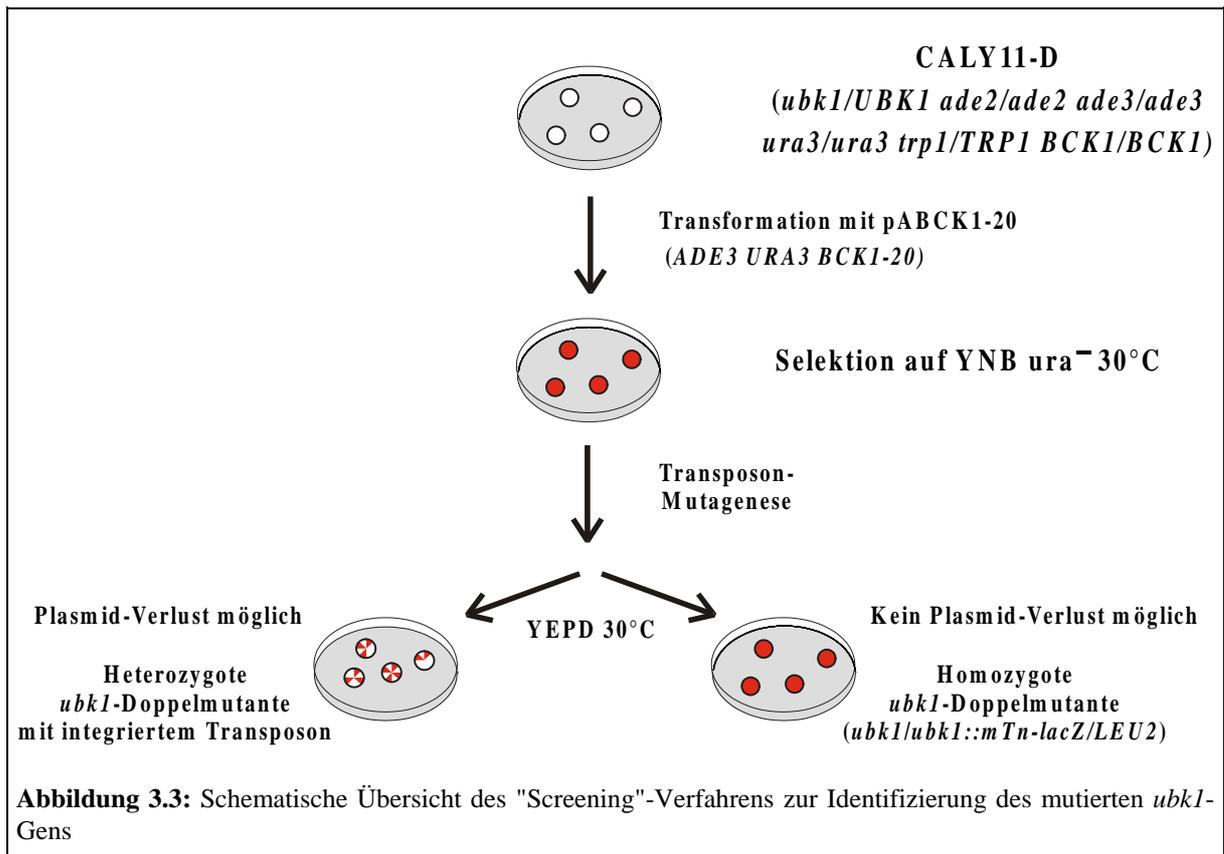
Marker	Plasmid	Integrationslocus (in Bp-Nummer)	Erhaltene Tetradentypen (Marker- <i>ubk1</i> )		
			Parentaler Dityp	Nicht-Parentaler Dityp	Tetratyp
<i>KanMX</i>	pAL170	87.202 - 89.928	8	6	38
<i>KanMX</i>	pAL171	184.330 - 185.560	19	12	74
<i>KanMX</i>	pAL172	252.016 - 252.689	7	4	26
<i>URA3</i>	pAL173	407.901 - 409.627	5	6	41
<i>URA3</i>	pAL182	475.343 - 476.902	8	9	43
<i>URA3</i>	pAL175	582.896 - 584.614	3	5	17
<i>TRP1</i>	pAL176	648.912 - 650.005	10	10	32
<i>TRP1</i>	pAL177	716.540 - 719.181	9	8	30
<i>TRP1</i>	pAL178	791.903 - 792.968	8	8	47
<i>LEU2</i>	pAL179	883559 - 886.681	9	5	38
<i>LEU2</i>	pAL180	947.947 - 950.306	15	9	59
<i>LEU2</i>	pAL181	1.028.783 - 1.030.216	4	2	19

Tabelle 3.2: Auswertung der Tetradenanalyse der auf Chromosom XV integrierten Marker

Bei einer Kopplung sollte sich eine erhöhte Anzahl "Parentaler Ditypen" zeigen und keine "Nicht-Parentalen Ditypen" auftreten. Bei freier Segregation sollte sich für die Aufspaltung von "Parentalen Ditypen" zu "Nicht-Parentalen Ditypen" zu "Tetratypen" eine Aufspaltung von 1:1:4 ergeben. Dieses Aufspaltungsverhältnis der Marken in bezug auf das *UBK1*-Gen findet sich annähernd bei allen betrachteten Kreuzungen. Da bei keiner Kreuzung ein gehäuftes Auftreten "Parentaler Ditypen" zu sehen war, wurde dies als Hinweis gedeutet, daß das *UBK1*-Gen nicht auf Chromosom XV lokalisiert ist. Ein erneute Kreuzung gegen Kartierungsstämme zeigte, daß die vermutete Lokalisation auf einem experimentellen Artefakt beruhte (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.1.5 Entwicklung eines "Screening"-Systems zur Identifizierung des *UBK1*-Gens

Da durch die bisher gewählten Ansätze das *UBK1*-Gen nicht identifiziert werden konnte, wurde eine weitere Strategie entwickelt. Dabei sollte das Kolonie-Sektorierungssystem (Bender und Pringle, 1991) verwendet werden, das auch schon bei der Isolierung des Mutanten-Stammes Y1 angewandt wurde (Jacoby, 1997). Das "Screening"-Verfahren ist in Abbildung 3.3 schematisch dargestellt. Dazu wurde der für die *ubk1*-Mutation heterozygote Stamm CALY11-D verwendet und mit dem Plasmid pABCK1-20 transformiert. Dieser Stamm ist aufgrund der Anwesenheit einer intakten Kopie des *UBK1*-Gens in der Lage, das Plasmid zu verlieren. Dies ist phänotypisch durch Bildung weißer Sektoren zu sehen. Durch eine Mutagenese dieses Stammes mit einer Transposon-Genbank (Burns *et al.*, 1994), sollte es möglich sein, durch Zerstörung des Wildtyp-Allels des *UBK1*-Gens Zellen zu identifizieren, die ohne das pABCK1-20-Plasmid nicht zum Wachstum befähigt sind. Diese Zellen könnten durch ihre rote Koloniefarbe identifiziert werden. Der Stamm CALY11-D, der das Plasmid pABCK1-20 trägt, wurde mit einer mit *NotI*-aktivierten Transposon-Genbank (siehe 2.1.3.4) transformiert. Etwa 7.000 Transformanden wurden auf Leucin-freiem Minimalmedium selektioniert.



Von diesen zeigten 46 eine rote Koloniefarbe. Nach einem weiteren Vereinzelausstrich zeigten nur noch 3 Stämme eine rote Koloniefarbe ohne die Bildung von Sektoren. Das hier integrierte Transposon wurde mittels ST-PCR (siehe 2.2.4.1) lokalisiert.

Mutante	Plasmid	Transposon-Integration
22-8	pAL184	2 $\mu$ -Plasmid
26-6	pAL185	<i>SDS24</i>
29-3	pAL186	2 $\mu$ -Plasmid

**Tabelle 3.3:** Lokalisierung der Transposons in verschiedenen Mutanten, die beim Koloniesektorierungs-Assay erhalten wurden

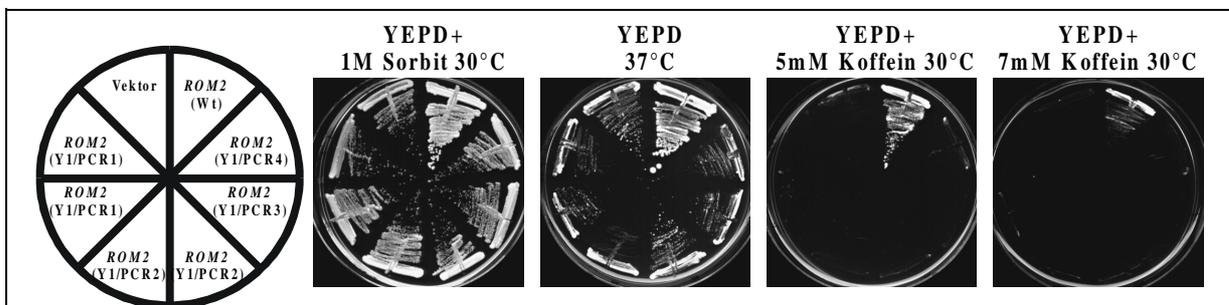
Bei zwei Transformanden zeigte sich, daß das Transposon ins endogene 2 $\mu$ -Plasmid integriert war. Bei der dritten Transformande war das Transposon in ein Gen namens *SDS24* integriert. Dieser Stamm bildete aber nach weiteren Ausstrichen weiße Sektoren, so daß es sich hierbei auch nicht um das gesuchte *UBK1*-Gen handeln konnte. Außerdem zeigte eine Tetraden-Analyse dieser drei Stämme, daß die Koffein-Sensitivität noch 2:2 aufspaltete und die Marke des integrierten Transposons, das *LEU2*-Gen, nicht mit der Koffein-Sensitivität segregierte (Daten nicht gezeigt). Auch dies bestätigte, daß in den isolierten Mutanten nur ein Allel des *UBK1*-Gens defekt war. Dieses "Screening"-Verfahren wurde aufgrund der hohen Anzahl an "Falsch-Positiven" nicht weiter verfolgt.

### 3.1.1.6 Das *ROM2*-Gen des Wildtyps komplementiert die *ubk1*-Mutante, während das *ROM2*-Gen aus verschiedenen *ubk1*-Mutanten nicht zur Komplementation fähig ist

Aufgrund parallel laufender Experimente deutete sich an, daß es sich bei der *ubk1*-Mutation möglicherweise doch um eine *rom2*-Mutation handeln könnte, im Gegensatz zu den von Jacoby (1997) erhaltenen Daten. Diese Vermutung lag nahe, da zum einen die Deletion eines Gens namens *LRG1* sowohl die *ubk1*-Mutanten als auch sehr effizient eine  $\Delta$ *slg1*- und eine  $\Delta$ *rom2*-Mutante supprimieren konnte (siehe 3.1.2.3, 3.1.2.5.1 und 3.1.2.5.2). Ein weiterer Hinweis, daß es sich bei dem *UBK1*-Gen um das *ROM2*-Gen handelt, kam aus Komplementationsanalysen der *ubk1*-Mutanten mit einer *Kluyveromyces lactis*-Genbank. Über heterologe Komplementation einer *ubk1*-Mutanten konnte so das *ROM2*-Homologe aus *K.lactis* isoliert werden (J.Heinisch, persönliche Mitteilung).

Daher wurde erneut getestet, ob es sich bei der *ubk1*-Mutation möglicherweise doch um eine *rom2*-Mutation handelt. Dazu wurden die Plasmide pAL193 und pAL194 konstruiert. Dabei handelt es sich um Niedrig-Kopienzahl-Vektoren (YCplac33 und YCplac111), die das *ROM2*-Gen enthalten. Diese Plasmide wurden auf ihre Fähigkeit getestet, den Stamm CALY11-3C zu komplementieren. Es zeigte sich, daß das *ROM2*-Gen die *ubk1*-Mutante auch in niedriger Kopienzahl vollständig komplementiert (Abbildung 3.4 und nicht gezeigte Daten). Bei Anwesenheit des Wildtyp-*ROM2*-Gens ist die *ubk1*-Mutante wieder in der Lage, ohne osmotische Stabilisatoren bei allen Temperaturen (14°C–37°C) zu wachsen, ebenso in Anwesenheit von Koffein.

Das aus vier verschiedenen *ubk1*-Segreganten (CALY11-3A, CALY11-3C, CALY11-7A, CALY11-7C) klonierte *ROM2*-Gen war jedoch nicht in der Lage, der *ubk1*-Mutanten ein Wachstum unter diesen Bedingungen zu ermöglichen (Abbildung 3.4). Aufgrund der sehr effizienten Suppression der *ubk1*-Mutanten durch das *ROM2*-Gen aus dem Wildtyp-Stamm, jedoch nicht aus den koffein-sensitiven *ubk1*-Segreganten, deutete sich hier schon an, daß das *UBK1*- und das *ROM2*-Gen allel sein könnten.



**Abbildung 3.4: Komplementation der *ubk1*-Mutanten mit dem *ROM2*-Gen aus dem Wildtyp und verschiedenen *ubk1*-Segreganten in niedriger Kopienzahl**

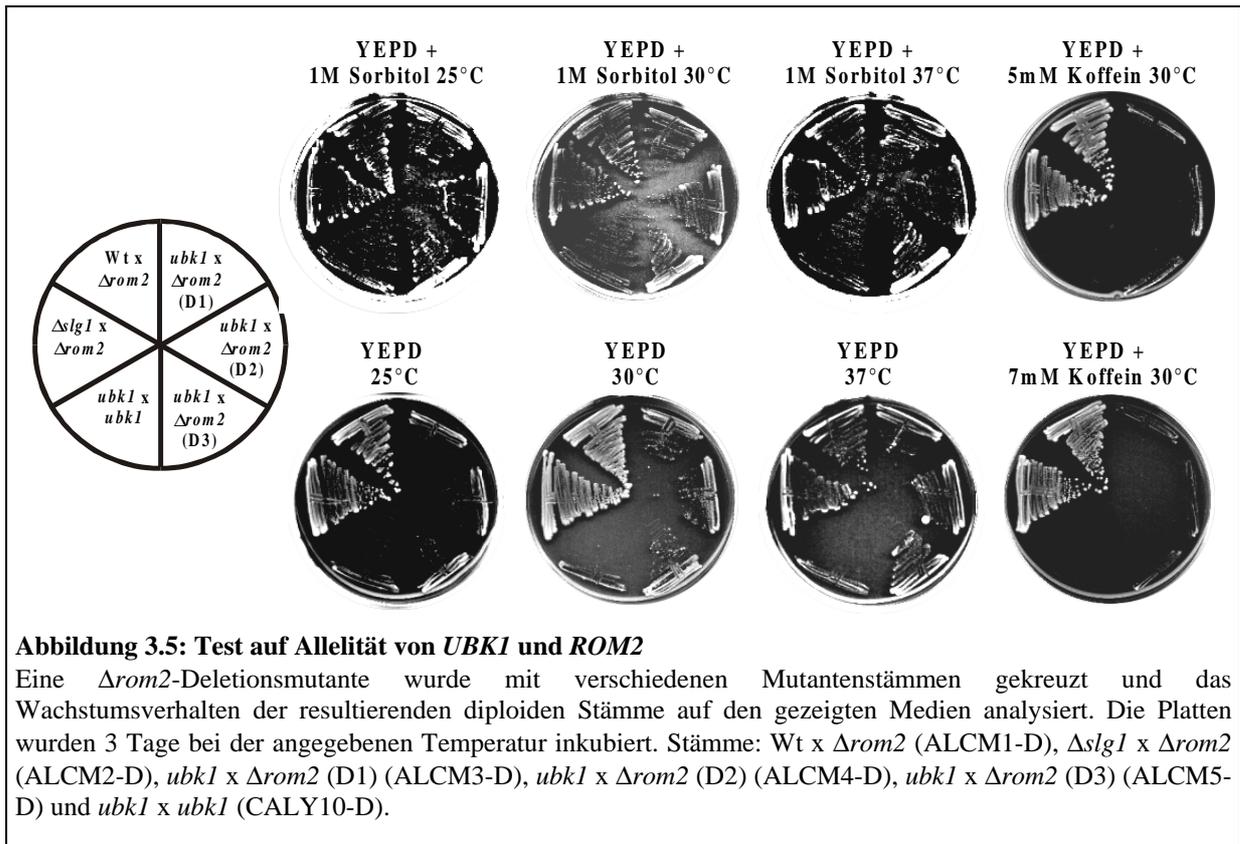
Die *ubk1*-Mutante (CALY11-3C) wurde mit den Plasmiden pAL193 (*ROM2* (Wt)), pAL195B (*ROM2* (Y1/PCR1)), pAL195C (*ROM2* (Y1/PCR2)), pAL195D (*ROM2* (Y1/PCR3)), pAL195E (*ROM2* (Y1/PCR4)) und mit dem Vektor YCplac33 als Kontrolle transformiert und auf Komplementation getestet. Die Transformanten wurden auf Sorbit-haltigem Uracil-freiem Medium selektioniert und anschließend auf die oben gezeigten Medien ausgestrichen und die Platten 3 Tage bei der angegebenen Temperatur inkubiert.

### 3.1.1.7 Test auf Allelität des *ROM2*-Gens mit dem *UBK1*-Gen

Da das *ROM2*-Gen in niedriger Kopienzahl die *ubk1*-Mutante komplementieren kann, liegt es nahe, daß der Stamm Y1 eine *rom2*-Mutation trägt. Dieser Verdacht sollte über Kreuzungsanalysen weiter erhärtet werden. Dazu wurden verschiedene *ubk1*-Mutanten mit  $\Delta$ *rom2*-Mutanten gekreuzt und das Wachstumsverhalten der Diploiden analysiert (Abbildung 3.5). Bereits in vorherigen Studien zeigten Mutanten in den Stämmen CH1113 und MCY-22D starke Unterschiede in der Ausprägung ihrer Phänotypen (Nilius, 1997; Jacoby *et al.*, 1998;

siehe auch Abschnitt 3.1.1.9 und Abbildung 3.9 A + B). Da die *ubk1*-Mutanten von dem Stamm CH1113 abstammen, während die  $\Delta rom2$ -Mutanten sich von dem Stamm MCY-22D ableiten, wurden zwei verschiedene Kontroll-Kreuzungen mitgeführt. Zum einen wurde der entsprechende Wildtyp-Stamm CH1113 mit der  $\Delta rom2$ -Mutanten gekreuzt. Zum anderen wurde eine andere Pkc1p-Weg-Mutante, eine *slg1*-Deletion im CH1113-Stamm (SNY1) mit der  $\Delta rom2$ -Mutanten gekreuzt.

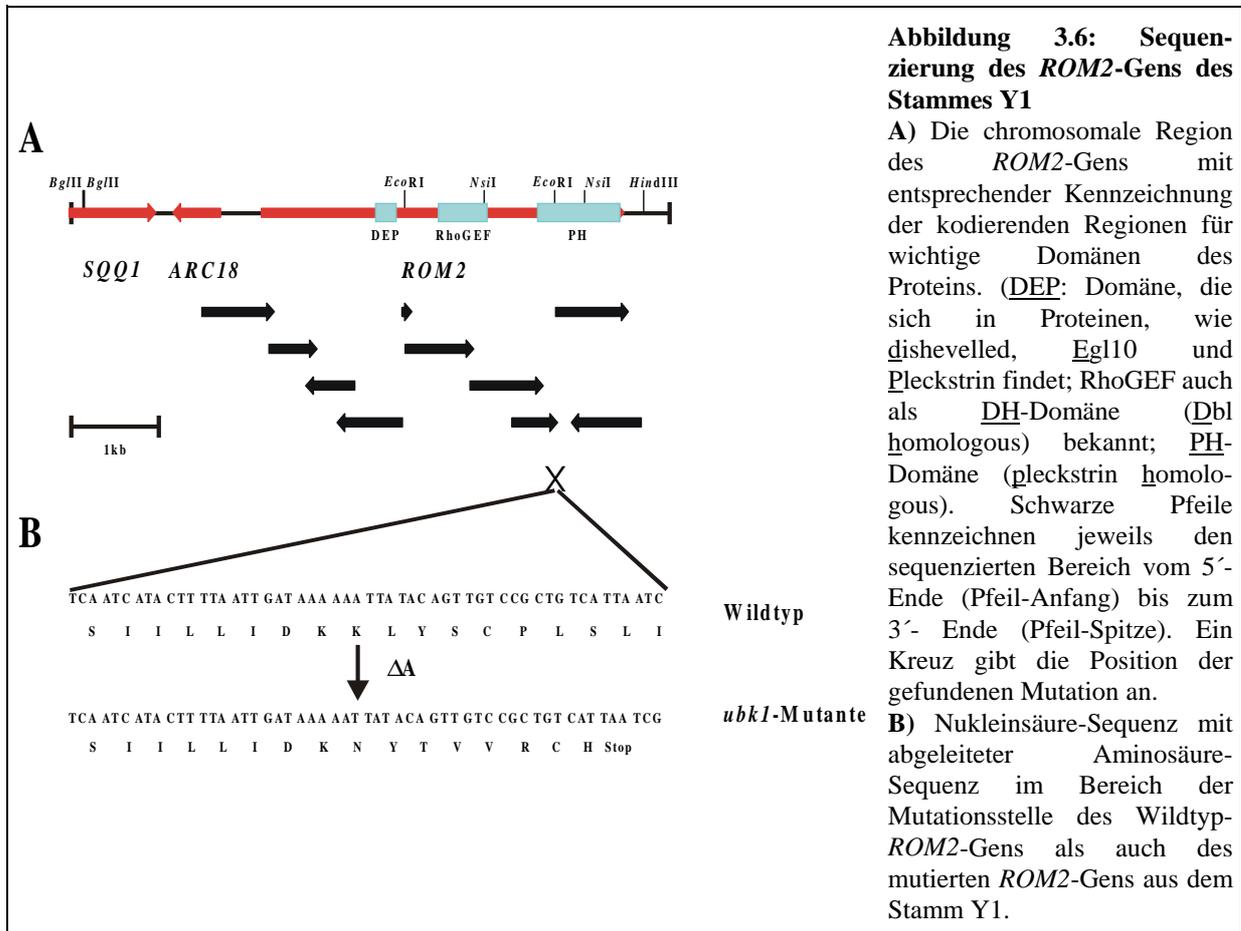
Sollte es sich bei der *ubk1*-Mutation tatsächlich um eine *rom2*-Mutation handeln, wäre eine Diploide sowohl Koffein- als auch osmosensitiv. Bei den zwei Kontrollkreuzungen sollten sich die Koffein- und Osmosensitivität nicht ausprägen dürfen, da hierbei noch ein intaktes *UBK1*-Gen in der Zelle vorhanden wäre. Die Phänotyp-Analyse der diploiden Stämme ist in Abbildung 3.5 gezeigt.



Die diploiden Stämme aus der Kreuzung der *ubk1*-Mutanten mit den  $\Delta rom2$ -Mutanten zeigen zwar keine Zellyse bei 37 °C ohne osmotische Stabilisatoren, aber eine ausgeprägte Koffein-Sensitivität. Im Gegensatz dazu zeigen die beiden Kontroll-Stämme sowohl ein Wachstum bei erhöhter Temperatur ohne osmotische Stabilisatoren, als auch in Anwesenheit von Koffein. Eine anschließende Tradenanalyse der Stämme ALCM4-D und ALCM5-D, die durch Kreuzung einer *ubk1*-Mutanten mit einer  $\Delta rom2$ -Mutanten entstanden waren, zeigte eine 4:0-Segregation für die Koffein-Sensitivität in 18 Traden (Daten nicht gezeigt). Auch diese Ergebnisse legten nahe, daß es sich bei dem *UBK1*-Gen um das *ROM2*-Gen handelt.

### 3.1.1.8 Sequenzierung des mutierten *ROM2*-Gens

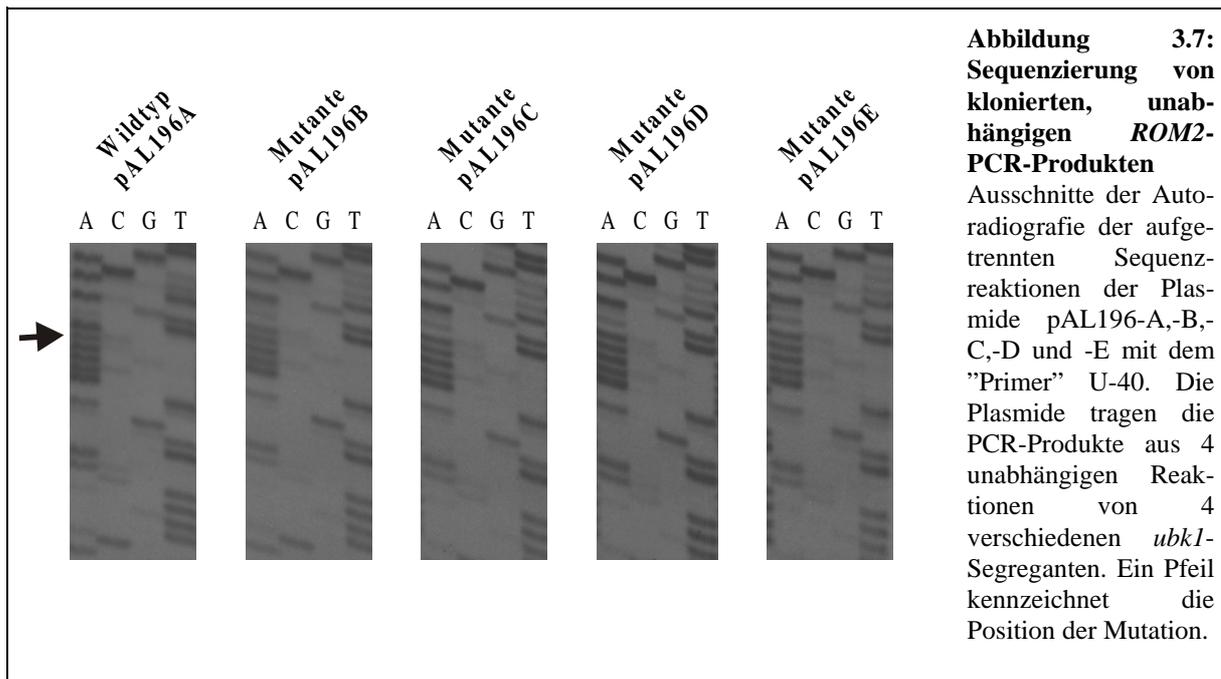
Um den letzten Beweis zu erbringen, daß die *ubk1*-Mutante ein defektes *ROM2*-Gen trägt, wurde eine Sequenzanalyse des *ROM2*-Gens aus der *ubk1*-Mutanten durchgeführt (Abbildung 3.6). So wurde die Insertion eines der nicht-komplementierenden Plasmide, pAL195F, das das *ROM2*-Gen aus dem Stamm Y1 trägt, sequenziert. Es fand sich eine Mutation an Position 3327 des offenen Leserasters (Abbildung 3.6 und 3.7).



Anstelle von 6 Adeninen finden sich nur 5 aufeinanderfolgende Adenin-Nukleotide (siehe Abbildung 3.6B und 3.7). Dadurch entsteht eine Rasterschub-Mutation, die zu einem verfrühten Stop-Codon führt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des mutierten Rom2-Proteins enthält dann nur 1116 Aminosäuren anstelle von 1365 (siehe Abbildung 3.6 B). Auffällig ist hier, daß die Verkürzung in einer sogenannten PH-Domäne endet.

Um sicher zu gehen, daß die gefundene Mutation nicht die Folge eines PCR-Fehlers ist, wurde der mutierte Bereich aus mehreren unabhängigen PCR-Produkten von verschiedenen Koffein-sensitiven *ubk1*-Segreganten sequenziert (Abbildung 3.7). Alle unabhängigen PCR-Produkte weisen die gleiche Mutation auf, während man diese bei dem PCR-Produkt des Wildtyps nicht findet.

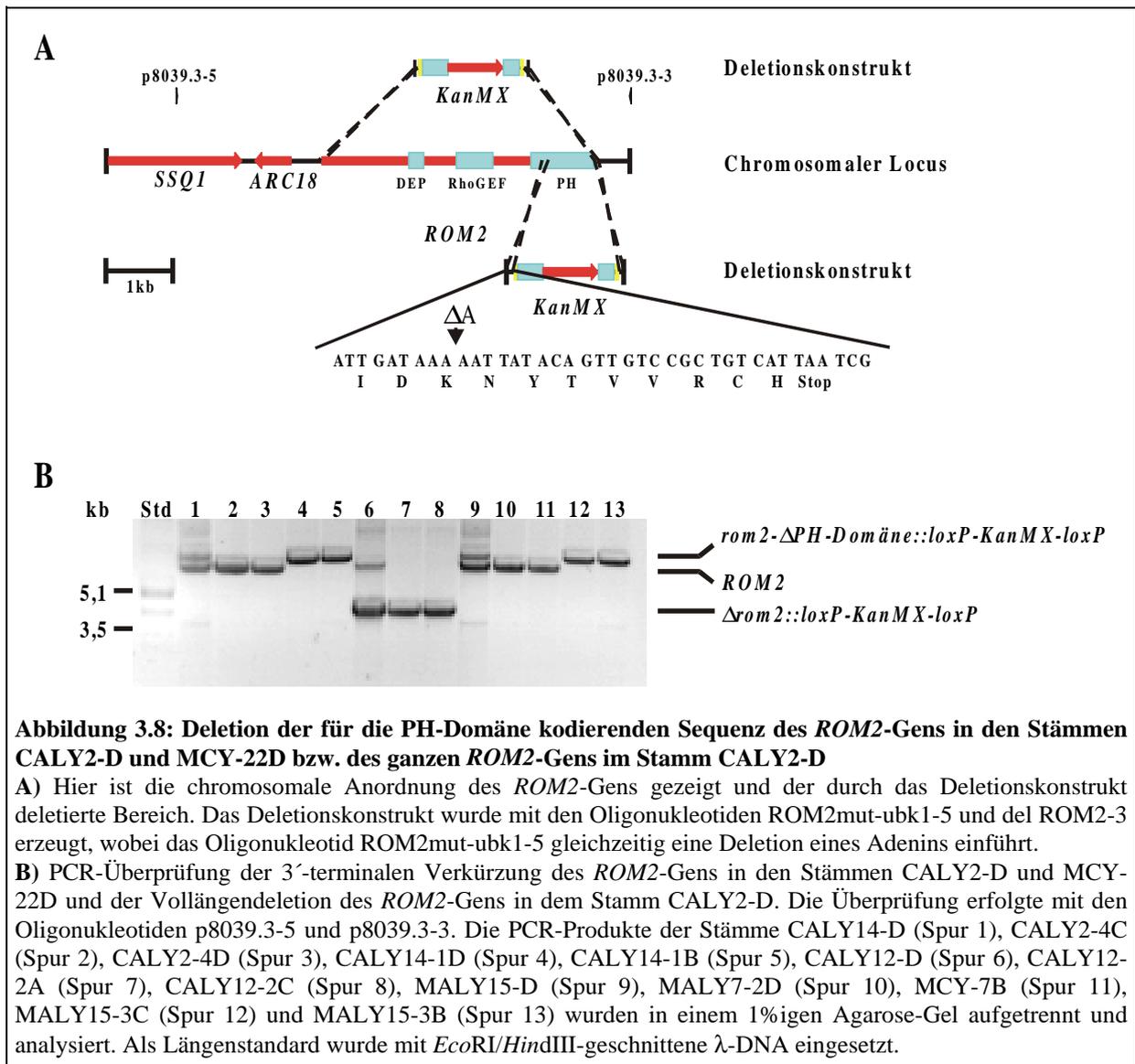
Sowohl der Komplementationstest, die Kreuzungs- und Tetradenanalyse, als auch die Sequenzanalyse zeigen, daß das lange gesuchte *UBK1*-Gen mit dem *ROM2*-Gen identisch ist.



### 3.1.1.9 Deletion der für die PH-Domäne kodierenden Region des *ROM2*-Gens

Die Sequenzanalyse zeigte, daß die Mutation zu einer Verkürzung des Proteins führt. Um eindeutig zu zeigen, daß das Fehlen bzw. die Veränderung der letzten 248 C-terminalen Aminosäuren den Phänotyp der *ubk1*-Mutanten hervorruft, wurde der für diese Aminosäuren kodierende Bereich in den diploiden Wildtyp-Stämmen CALY2-D und MCY-22D deletiert. Im Anschluß daran sollten die Phänotypen von C-terminal-verkürzten *rom2*-Mutanten mit Mutanten verglichen werden, die eine vollständige Deletion des *ROM2*-Gens tragen. Zur Deletion des 3'-kodierenden Bereichs diente ein mithilfe der PCR amplifiziertes *loxP-KanMX-loxP*-Deletionskonstrukt, das wie unter 2.2.2.1 beschrieben, gewonnen wurde (Abbildung 3.8A). Die Deletionsstämme wurden mit CALY14-D und MALY15-D bezeichnet. Da die C-terminal deletierten *rom2*-Mutanten mit vollständig deletierten  $\Delta rom2$ -Mutanten verglichen werden sollte, mußten diese Stämme auch noch konstruiert werden. Für den Vergleich mit dem Stamm, der die vollständige Deletion des *ROM2*-Gens in dem Stamm MCY-22D trägt, wurden die unter 3.1.2.5.1 erzeugten Stämme MALY7-4C und MALY7-7B verwendet. Zum Vergleich mit einem Stamm mit einer vollständigen Deletion des *ROM2*-Gens, der sich von dem Stamm CH1113 ableitet, wurde der Stamm CALY12-D erzeugt. Für diesen Stamm wurde das *ROM2*-Gen in dem Stamm CALY2-D mit einem über PCR-generierten *loxP-KanMX-loxP*-Deletionskonstrukt deletiert. Nach einer Tetradenanalyse wurde mit den *rom2*-Segreganten (CALY14-1B, CALY14-1D, CALY12-2A, CALY12-2C, MALY15-3B und MALY15-3C) weitergearbeitet. Die entsprechenden PCR-Überprüfungen finden sich in Abbildung 3.8 B.

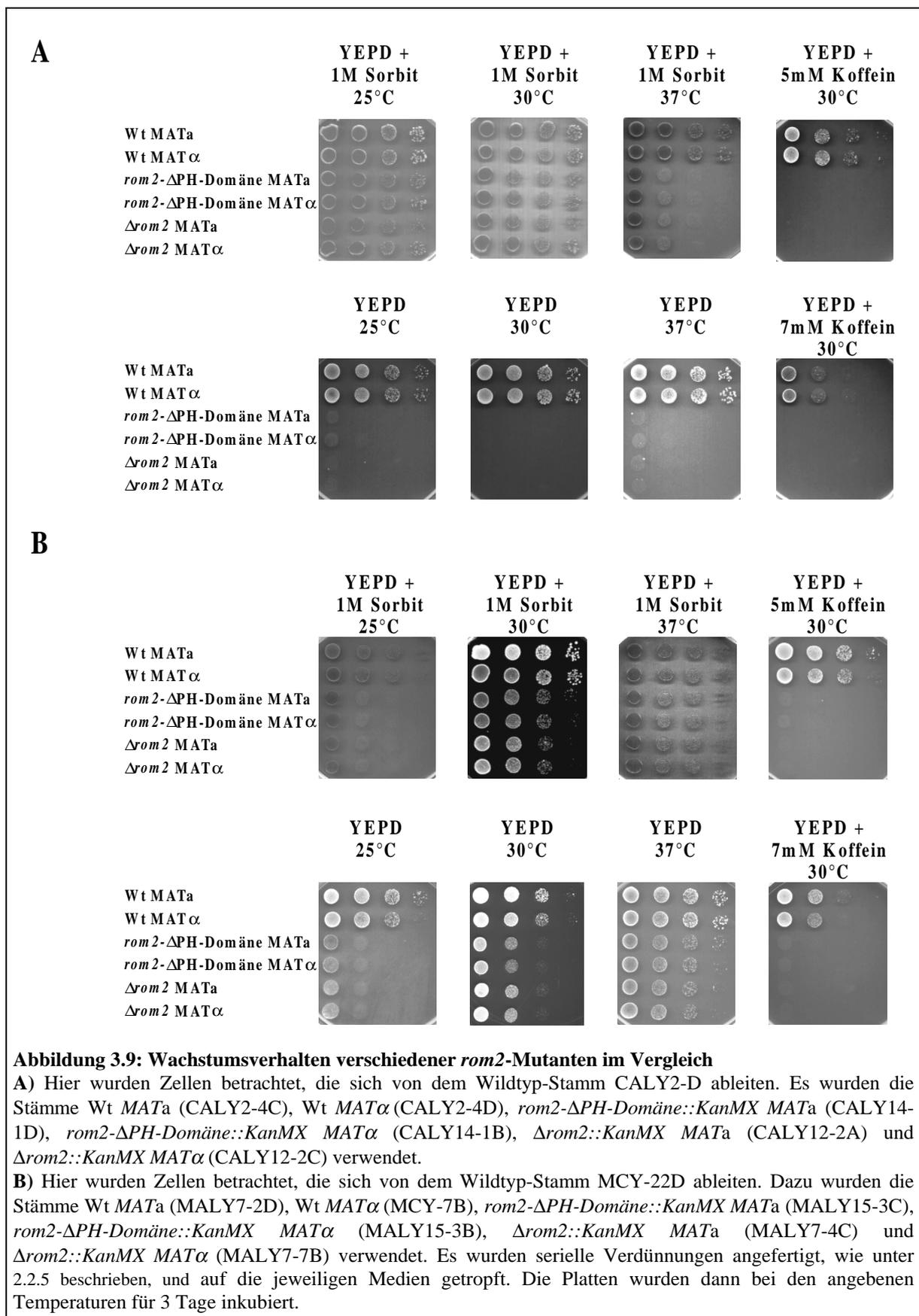
Die Konstruktion und PCR-Überprüfung der Vollängendeletion des *ROM2*-Gens im MCY-22D-Stammhintergrund findet sich unter 3.1.2.7.1.



Nach Überprüfung der korrekten Deletionen wurden entsprechende Segreganten auf ihr Wachstum unter verschiedenen Bedingungen getestet. Die Wachstumsanalyse ist in Abbildung 3.9 wiedergegeben.

Abbildung 3.9 A zeigt das Wachstumsverhalten von Stämmen, die sich alle von dem Stamm CALY2-D ableiten. Es zeigt sich, daß bei allen getesteten Temperaturen die C-terminale Verkürzung das gleiche Wachstumsverhalten zeigt wie die Vollängen-Deletion. Gleiches gilt auch für die Stämme, die sich von dem Stamm MCY-22D ableiten.

Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Stämmen ist, daß *rom2*-Mutanten, die sich vom Stamm CH1113 ableiten, bei höherer Temperatur trotz Zugabe osmotischer Stabilisatoren schlechter wachsen. Anders verhalten sich *rom2*-Mutanten, die sich von MCY-22D ableiten (Abbildung 3.9B). Diese wachsen bei erhöhter Temperatur (37°C) auf Sorbit-haltigem Medium besser als bei niedrigeren Temperaturen (25°C oder 30°C). Die unterschiedliche Ausprägung der Phänotypen erklärt auch, warum sich bei den unter 3.1.1.7 erzeugten Diploiden die Temperatur-Sensitivität der ursprünglichen *ubk1*-Mutanten nicht ausprägte: In dem Stamm, gegen den die *ubk1*-Mutante gekreuzt wurde, zeigt die *rom2*-Mutation bei 37°C keinen so ausgeprägten Phänotyp.



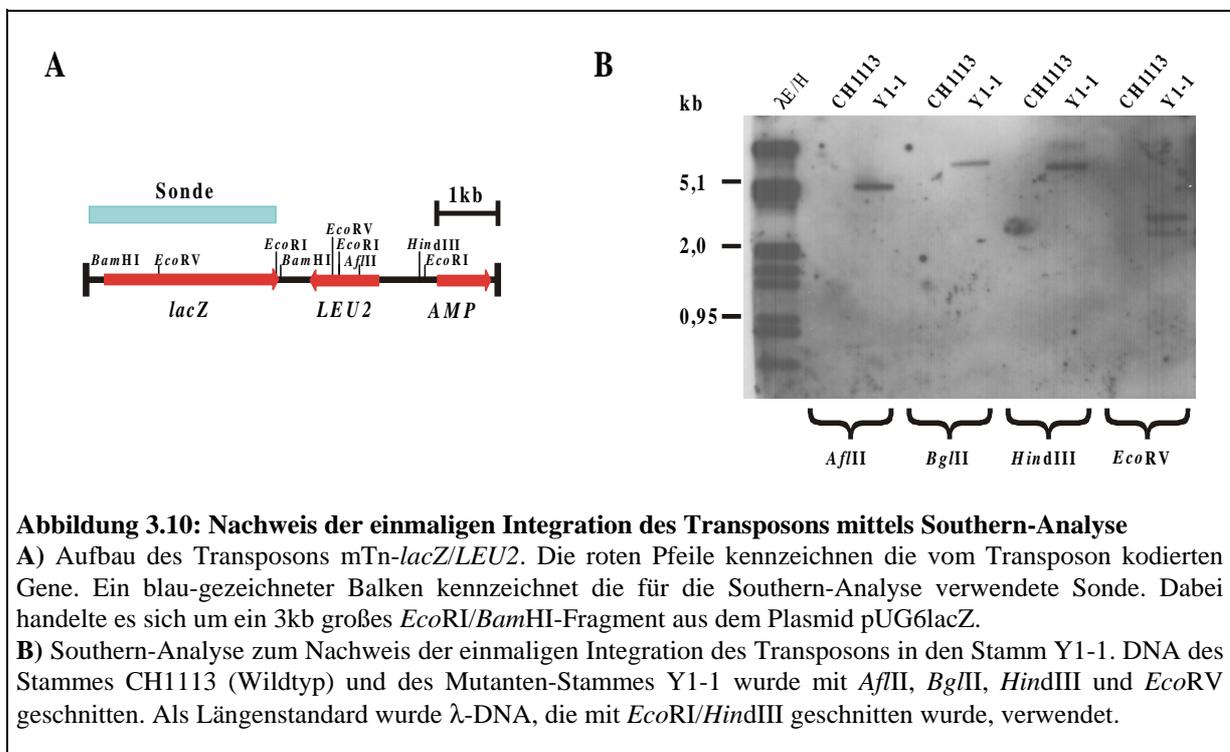
Die Deletion von nur 248 Codons resultiert also im gleichen Phänotyp wie die Deletion des vollständigen offenen Leserahmens des *ROM2*-Gens.

### 3.1.2 Charakterisierung des Mutanten-Stammes Y1-1

Im Laufe der Versuche das *UBK1*-Gen zu identifizieren, wurde auch eine Transposon-Genbank eingesetzt, deren Transposons durch genomische Wildtyp-Sequenzen flankiert sind. Durch Transformation und anschließende Integration dieser Sequenzen in das Genom des Stammes Y1 sollte sich auch das Wildtyp-Allel des defekten *ubk1*-Gens wiederherstellen lassen. Da dieser genomische Locus durch das Transposon markiert wäre, sollte sich die Identifizierung des Gens als einfach erweisen. Die Transposon-Mutagenese wurde von Jörg Jacoby durchgeführt. Dabei wurde die Mutante Y1-1 erhalten, die im Gegensatz zum Stamm Y1 wieder die Fähigkeit hat, ohne osmotische Stabilisatoren oder das konstitutiv-aktive *BCK1-20*-Allel wachsen zu können. Diese Mutante sollte nun näher charakterisiert werden.

#### 3.1.2.1 Southern-Analyse zum Nachweis des Transposons im Genom des Stammes Y1-1

Bei jeder Transposon-Mutagenese integrieren in bis zu 12% der Fälle mehr als ein Transposon in das Genom (Burns *et al.*, 1994 und P. Ross-MacDonald, persönliche Mitteilung). Daher mußte zuerst sichergestellt werden, wie oft ein Transposon in das Genom der Y1-1-Mutanten integriert vorlag. Dazu wurde eine Southern-Analyse durchgeführt (Abbildung 3.10).

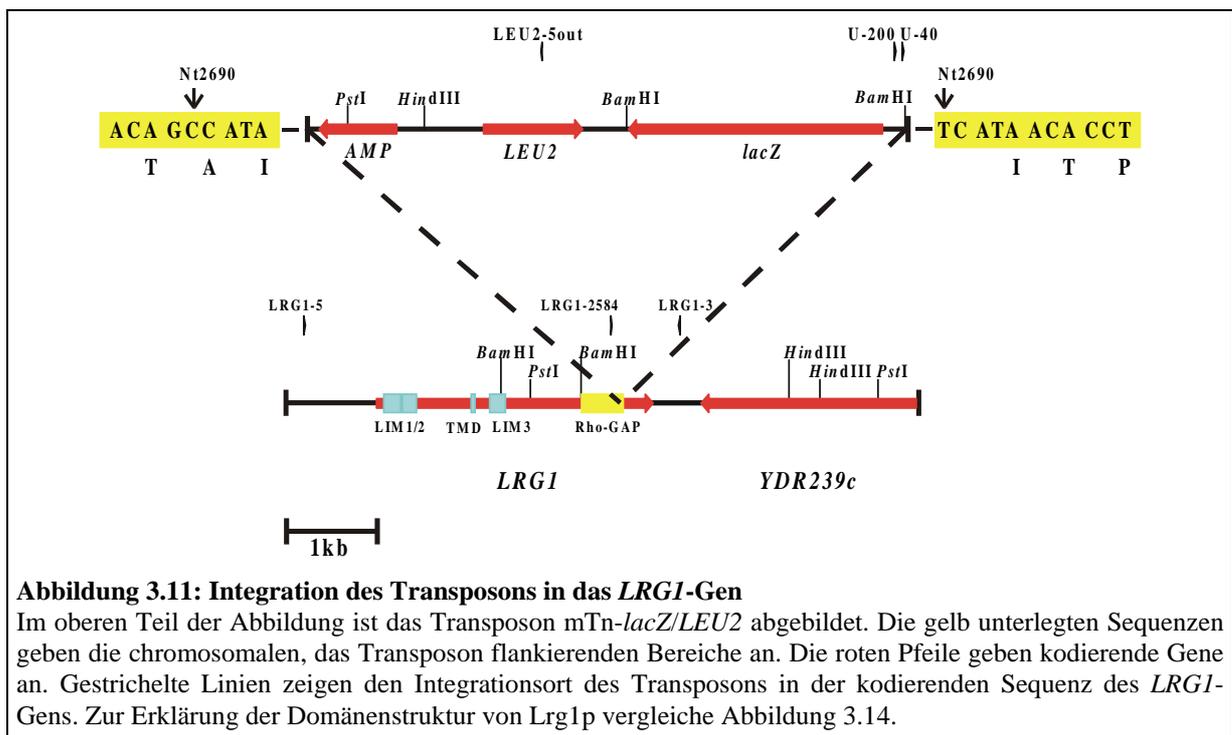


Genomische DNA des Wildtyp-Stammes CH1113 und der Y1-1-Mutanten wurden mit verschiedenen Enzymen geschnitten. Als Sonde diente ein internes Fragment des Transposons, das *lacZ*-Gen, das nur mit Transposon-Sequenzen hybridieren sollte. Die Southern-Analyse zeigte bei 3 verwendeten Enzymen nur jeweils eine Bande bei der chromosomalen DNA des Stammes Y1-1. Es zeigte sich eine Bande von etwa 5kb bei der Restriktion mit *Af*III, eine etwa 10kb-Bande bei der Restriktion mit *Bg*III und eine Bande von etwa 7kb bei der mit *Hind*III-restringierten DNA. Nur bei der Restriktion mit dem Enzym *Eco*RV ergaben sich zwei Banden von ca. 2,2kb und 2,8kb. Das Auftauchen dieser zwei Banden ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß das Enzym *Eco*RV eine Erkennungssequenz im Transposon aufweist. Die DNA des Wildtyp-Kontrollstamms CH1113 hybridisierte, wie erwartet, nicht mit der verwendeten Sonde.

Diese Southern-Analyse zeigt eindeutig, daß nur ein Transposon in das Genom des Stammes Y1-1 integriert ist.

### 3.1.2.2 Isolierung des chromosomal integrierten Transposons mit 5'-flankierendem Bereich und Sequenzierung

Um den chromosomalen Abschnitt zu identifizieren, in den das Transposon integriert war, wurde eine Methode gewählt, bei der ein Vektor in das Transposon integriert wird und durch anschließendes Schneiden und Ligieren von chromosomaler DNA ein Plasmid isoliert werden kann, das das Transposon-flankierende Bereiche enthält (siehe 2.2.4.1). Auf diesem Wege wurde das Plasmid pAL166 erhalten. Die Sequenzierung dieses Plasmides ergab, daß das Transposon vor dem Nukleotid 2690 des offenen Leserasters eines Gens, das unter dem Namen *LRG1* (*YDL240W*) in der Datenbank eingetragen ist, integriert war (Abbildung 3.11).



Zur weiteren Überprüfung wurden die Plasmide pAL189 und pAL190 konstruiert. pAL189 enthält das ca. 700bp große PCR-Fragment, das mit den Oligonukleotiden LRG1-3 und U-200 (Abbildung 3.11) von chromosomaler DNA des Stammes Y1-1 erhalten und in den mit *Bam*HI/*Hind*III-geschnittenen Vektor pUC19 kloniert wurde. Die Sequenzierung dieses Plasmids mit dem Oligonukleotid U-40 ergab auch hier eine Integration des Transposons vor das Nukleotid 2690 des offenen Leserasters des Gens *LRG1*. Bei pAL190 wurde das mit den Oligonukleotiden LRG1-5 und LEU2-5out erzeugte ca. 6000 bp große PCR-Produkt mit dem Enzym *Pst*I geschnitten und ein 1,5kb Fragment in den mit *Pst*I-geschnittenen Vektor pUC19 kloniert. Die Sequenzierung dieses Plasmids mit dem Oligonukleotid LRG1-2584 erbrachte die Integration des Transposons hinter das Nukleotid 2695 des offenen Leserasters des *LRG1*-Gens. Dies ist zurückzuführen auf die Verdopplung einer 5bp-großen Zielsequenz, die für das Transposon 3 (Tn3; Reed *et al.*, 1979), von dem sich das verwendete Transposon mTn-*lacZ/LEU2* ableitet (Seifert *et al.*, 1986), beschrieben ist. Es findet sich jedoch keine exakte Verdopplung. Die verdoppelte Sequenz weicht an Position 2690 voneinander ab. Hier befindet sich ein Cytosin anstelle eines Thyminids. Dies könnte durch einen Polymorphismus des Empfänger-Stammes CH1113 und des Spender-Stammes der genomischen DNA der Transposon-Genbank an dieser Position verursacht sein. Welche Sequenz von welchem

Stamm stammt, ist unklar. Dazu müßte dieser Bereich beider Stämme erneut sequenziert werden. Darauf wurde hier aber verzichtet, da es sich bei der Änderung des Codons TCA zu dem Codon CCA um einen konservativen Austausch von einem Valin zu einem Alanin handelt und für die Funktion des Proteins nicht wichtig sein sollte.

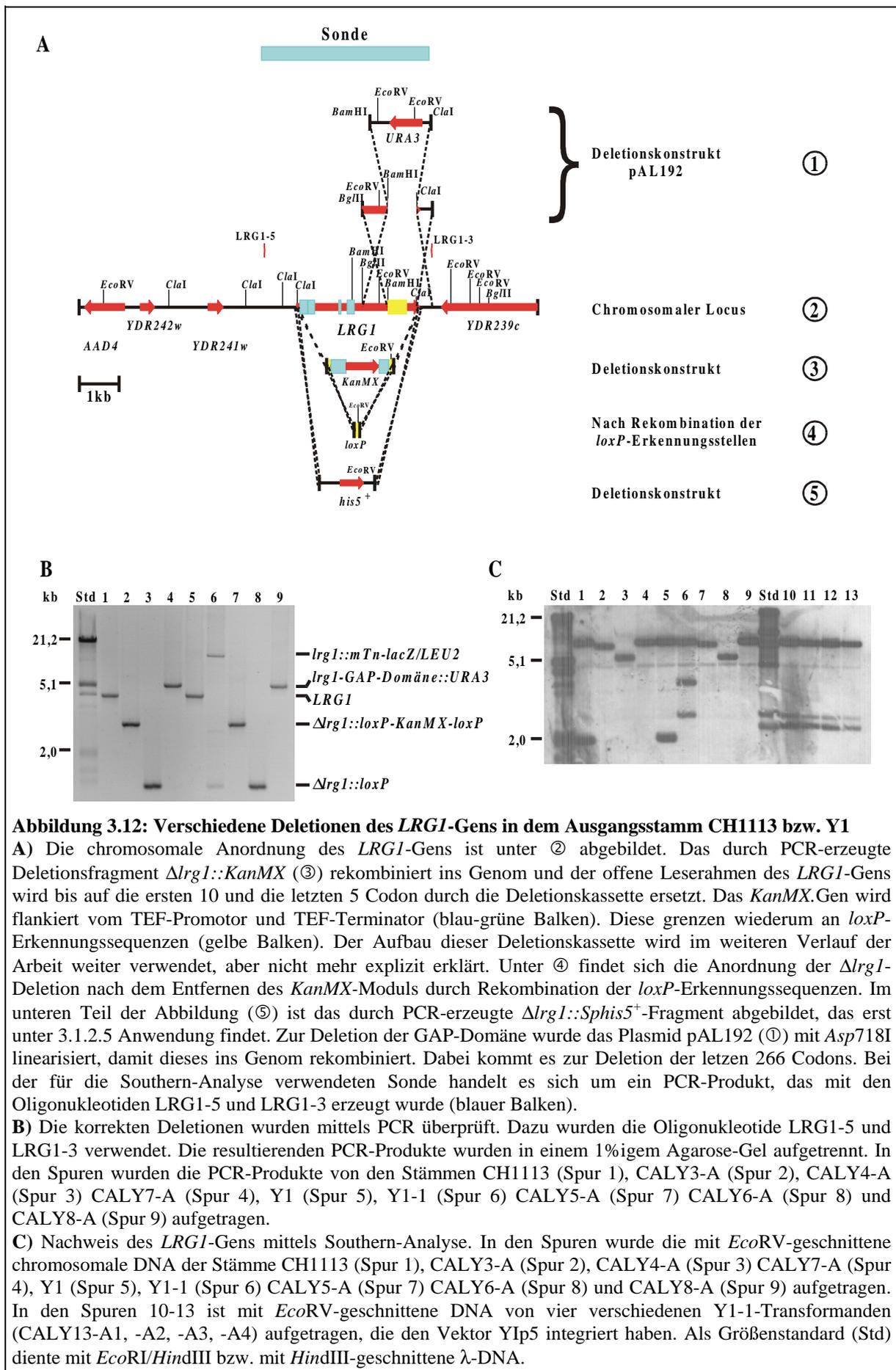
Der damit festgelegte Integrationsort des Transposons stimmt mit den in der Southern-Analyse (Abbildung 3.10) erhaltenen Banden überein. Durch die Integration wird das *Lrg1*-Protein von 1017 Aminosäuren auf 898 Aminosäuren verkürzt.

### 3.1.2.3 Supprimiert ein nicht-funktionelles *Lrg1*-Protein die Phänotypen der *ubk1*-Mutanten?

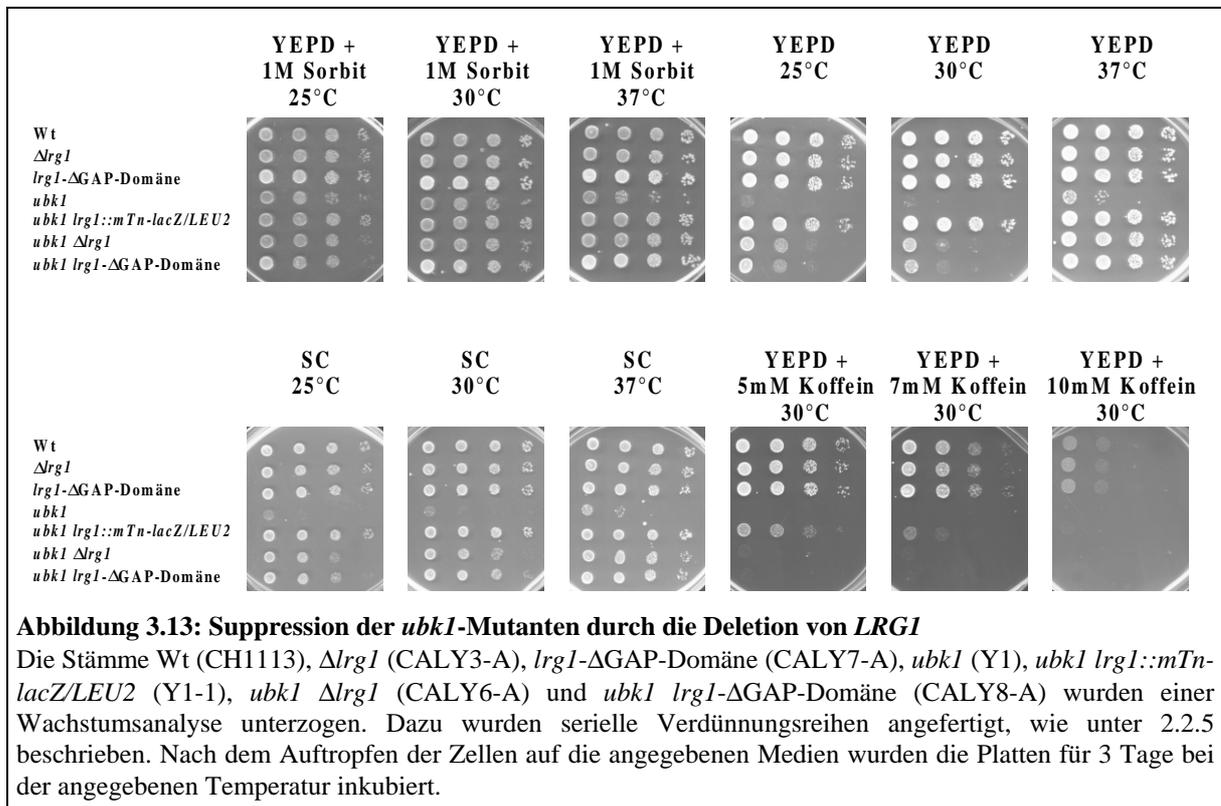
Zum Zeitpunkt der Lokalisierung des Transposons im *LRG1*-Gen des Stammes Y1-1 war noch nicht bekannt, welche Mutation die *ubk1*-Mutante trägt. Somit konnte die Fähigkeit des Stammes Y1-1 wieder ohne osmotische Stabilisatoren wachsen zu können, auf zwei Ursachen zurückzuführen sein:

Zum einen konnte das *UBK1*-Gen flankierend zum integrierten Transposon, in diesem Fall zum *LRG1*-Gen liegen. Durch Rekombination mit Transposon-flankierenden Wildtypsequenzen könnte damit das *ubk1*-Gen wieder in seine Wildtyp-Form überführt worden sein. Zum anderen bestand die Möglichkeit, daß durch die Disruption des *LRG1*-Gens der Lyse- und Koffein-sensitive Phänotyp des Stammes Y1 supprimiert wird. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde das *LRG1*-Gen in der *ubk1*-Mutanten als auch im Wildtyp-Stamm CH1113 deletiert. Dazu wurden zwei verschiedene Deletionskonstrukte verwendet. Zum einen wurde der ganze offene Leserahmen durch ein mit den Oligonukleotiden LRG1.5del und LRG1.3del über PCR-erzeugtes *loxP-KanMX-loxP*-Deletionskonstrukt ersetzt (siehe 2.2.2.1). Zum anderen wurde das Deletionsplasmid pAL192 konstruiert. Dieses Konstrukt führt zur Deletion der letzten 264 Codons, so daß die GAP-Domäne des *Lrg1*-Proteins fehlt. Das *Lrg1*-Protein weist dann nur noch eine Länge von 753 Aminosäuren auf anstelle einer Länge von 1017 Aminosäuren.

Transformanden wurden mittels Southern- und PCR-Analyse überprüft (siehe Abbildung 3.12). Die PCR zeigt für die Stämme CH1113 und Y1 die Wildtyp-*LRG1*-Bande von 4,2kb, für die Stämme CALY3-A und CALY5-A die  $\Delta lrg1::loxP-KanMX-loxP$ -Bande von 2,8kb, für die Stämme CALY4-A und CALY6-A die  $\Delta lrg1::loxP$ -Bande von 1,3kb, für die Stämme CALY7-A und CALY8-A die  $\Delta lrg1::URA3$ -Bande von 5kb und letztendlich eine Bande von 10,8kb des Stammes Y1-1, der das integrierte Transposon im *LRG1*-Gen trägt. Auch die Southern-Analyse bestätigte die korrekten Deletionen. Neben den in der PCR verwendeten Stämmen wurden auch 4 Transformanden getestet, die den Vektor YIp5 ins Transposon integriert haben sollten (Spur 10-13). Diese Stämme wurden mit der unter 2.2.4.1 beschriebenen Methode zur Identifizierung des Transposons verwendet. Es ergeben sich die Banden 6,8kb, 2,0kb und 2,3kb für diese Stämme, die bestätigen, daß YIp5 in das Transposon integriert war.



Nach Bestätigung der korrekten Deletionen des *LRGI*-Gens in den verschiedenen Stämmen wurden Wachstumsanalysen durchgeführt (Abbildung 3.13). Sowohl die vollständige Deletion des *LRGI*-Gens als auch die ausschließliche Deletion des für die GAP-Domäne kodierenden Bereichs supprimieren den Wachstumsdefekt des Stammes Y1 bei 25°C, 30°C und 37°C ohne osmotische Stabilisatoren. Die Suppression der Koffein-Sensitivität der *ubk1*-Mutanten durch zusätzliche Deletion des *LRGI*-Gens ist eher schwach. Ferner führt die ausschließliche Deletion des *LRGI*-Gens bzw. der GAP-Domäne im Wildtyp-Stamm unter den hier getesteten Bedingungen zu keinem sichtbaren Phänotyp.

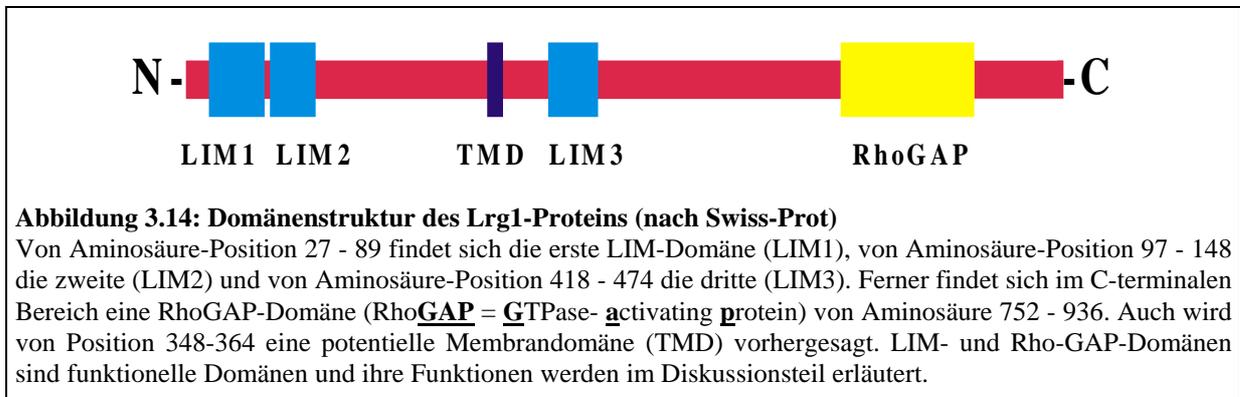


Dieses Experiment zeigte, daß die Fähigkeit des Stammes Y1-1 ohne osmotische Stabilisatoren wachsen zu können nicht auf das Wiederherstellen des Wildtyp-*UBK1*-Gens zurückzuführen ist. Vielmehr supprimiert die Disruption des *LRGI*-Gens einige Wachstumsphänotypen der *ubk1*-Mutanten. Ferner zeigt sich, daß nicht nur die vollständige Deletion des *LRGI*-Gens diesen Effekt hervorruft sondern, daß die Deletion der GAP-Domäne ausreicht, um die Suppression zu vermitteln. Es fällt aber auf, daß der durch die Transposon-Mutagenese gewonnene Mutanten-Stamm Y1-1 auf Koffein-haltigem Medium und auf Vollmedium bei 25°C und 30°C im Vergleich zu den *ubk1 \Delta lrg1*- oder den *ubk1*- $\Delta$ GAP-Domäne-Mutanten besser wächst.

#### 3.1.2.4 Das *LRGI*-Gen und sein kodiertes Protein

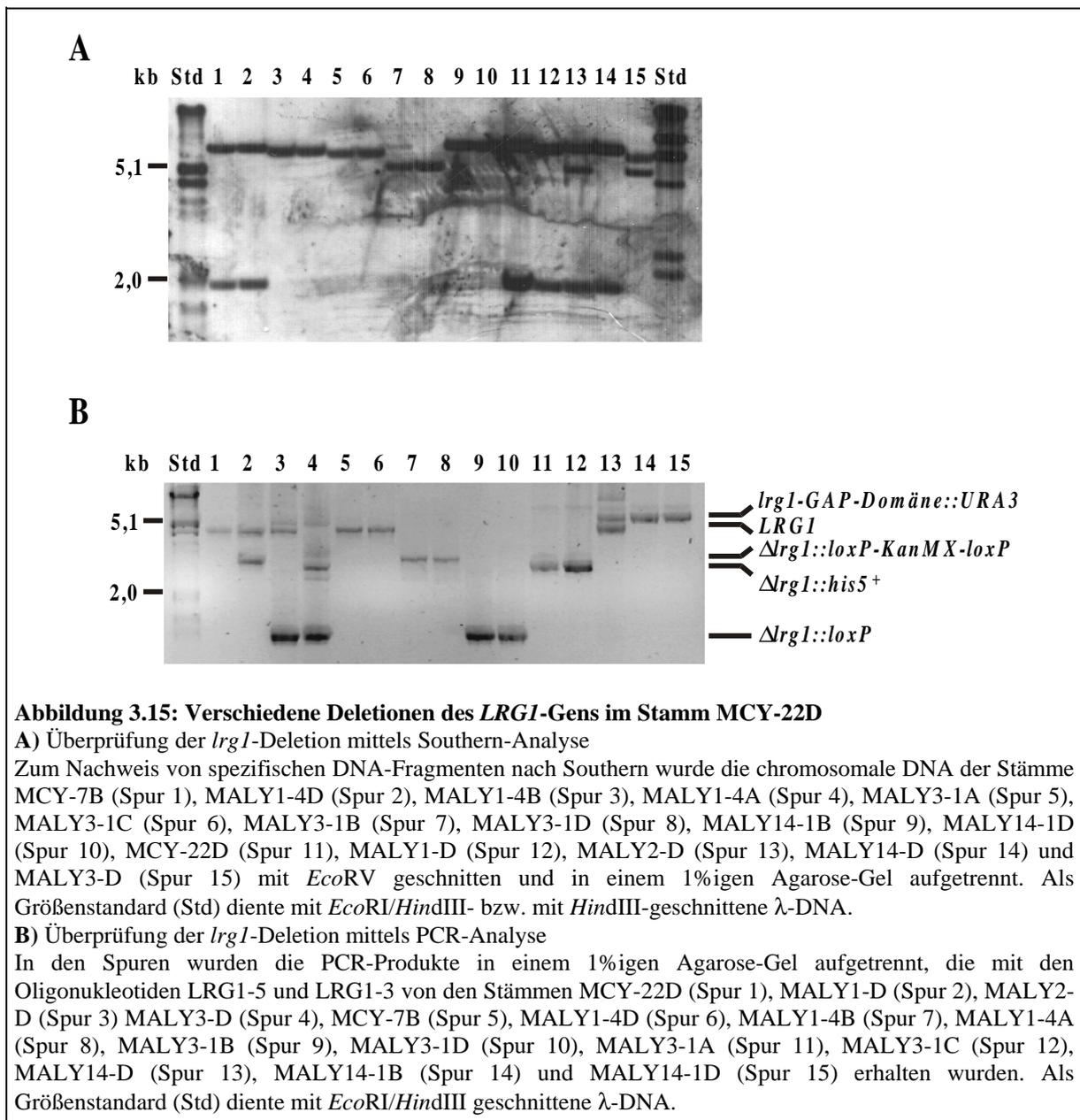
Der offene Leserahmen des *LRGI*-Gens umfaßt 3054 Nukleotide und kodiert für ein Protein von 1017 Aminosäuren mit einer abgeleiteten Masse von 116,7 kD. Dieses Gen wurde bereits von Müller *et al.* (1994) beschrieben. Die Autoren postulierten hier eine Beteiligung des Lrg1-Proteins an der Paarung und bei der Sporulation. Der Name ***LRGI*** steht dabei als Abkürzung für die Bezeichnung "**L**IM-**R**ho**G**AP homologous gene product".

Die Analyse des Lrg1-Proteins mit Hilfe des Programmes "SMART" ergab folgende Domänen-Struktur (Abbildung 3.14; Ponting *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000):



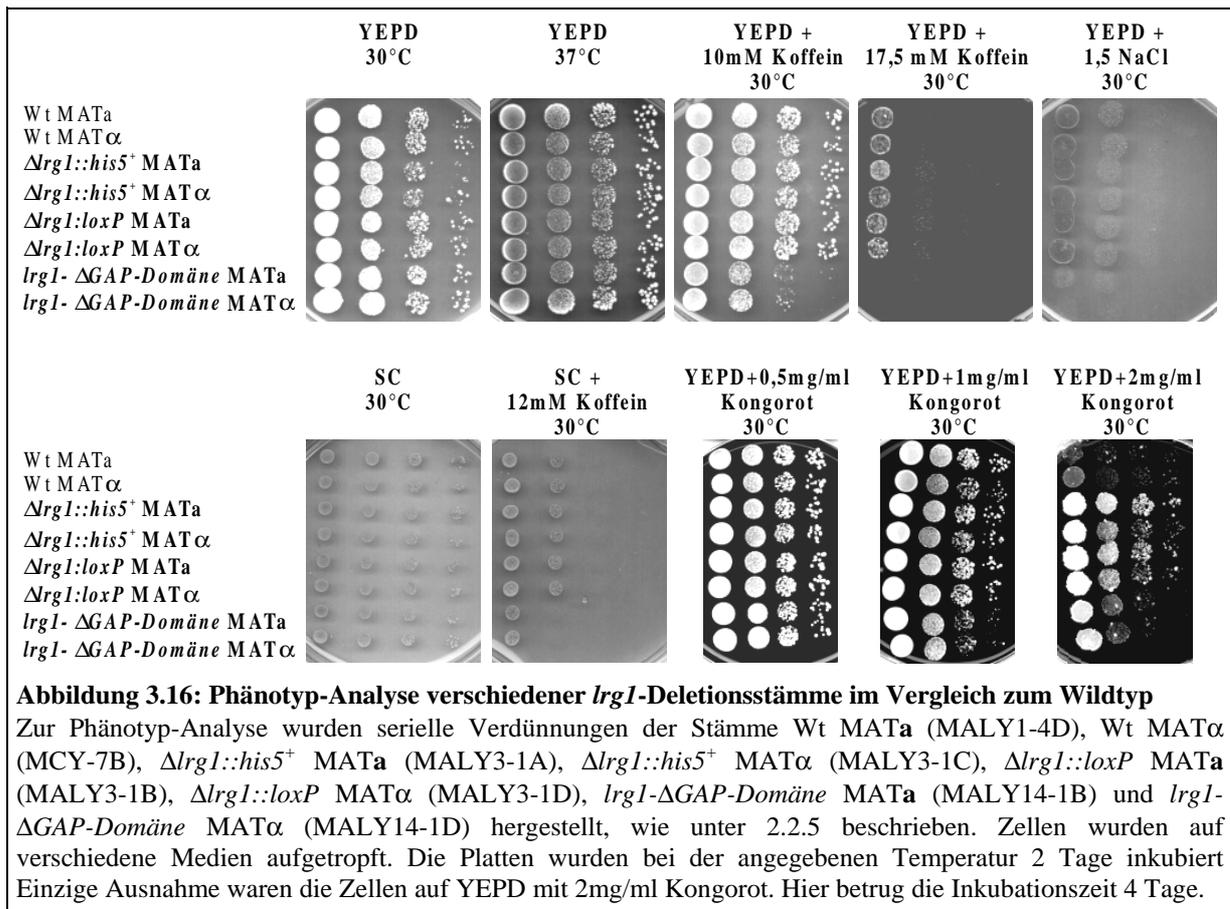
### 3.1.2.5 Deletion des *LRG1*-Gens und phänotypische Analyse

Um zu sehen, ob die Deletion des *LRG1*-Gens alleine auch schon zu einem Phänotyp führt, wurde auch hier mit dem durch PCR erzeugten *lrg1::KanMX*-Deletionskonstrukt der diploide Wildtyp-Stamm MCY-22D transformiert. Die resultierende Heterozygote wurde als MALY1-D bezeichnet. Nach Sporulation und anschließender Tetraden-Analyse wurde mit zwei G418-resistenten Sporen (MALY1-4B und MALY1-4A) weitergearbeitet. Desweiteren wurde die *KanMX*-Marke in dem Stamm MALY1-D, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, regeneriert, um den Stamm MALY2-D hervorzubringen. In diesem Stamm wurde das zweite *LRG1*-Allel mit dem durch PCR-generierten Konstrukt  $\Delta lrg1::Sphis5^+$  deletiert. Es entstand der Stamm MALY3-D. Nach Sporulation und anschließender Tetradenanalyse wurden hier die Sporen MALY3-1A, MALY3-1B, MALY3-1C und MALY3-1D ausgesucht. Da die Deletion der GAP-Domäne alleine schon zur Suppression einer *ubk1*-Mutanten ausreichte, sollte der Phänotyp dieser Deletion auch weiter untersucht werden. Dazu wurde der Stamm MCY-22D mit dem mit *Asp718I*-linearisierten Plasmid pAL192 transformiert. Dieser Stamm wurde mit MALY14-D bezeichnet. Die weiter getesteten haploiden Stämme sind MALY14-1B und MALY14-1D. Die chromosomale Anordnung des *LRG1*-Gens und die Deletionskonstrukte finden sich in Abbildung 3.12A. Die entsprechende Southern- und PCR-Überprüfung dieser Stämme ist in Abbildung 3.15 gezeigt. Die Southern-Analyse (Abbildung 3.15A) als auch die PCR-Analyse bestätigten, daß in allen Stämmen das *LRG1*-Gen deletiert ist.



Die erhaltenen Mutanten wurden auf ihr Wachstum unter verschiedenen Bedingungen getestet (Abbildung 3.16).

Auf Vollmedium (YEPD) und Minimalmedium (SC) bei 14°C, 25°C, 30°C und 37°C zeigten die getesteten Stämme keine Unterschiede (Abbildung 3.16 und nicht gezeigt). In Anwesenheit von mindestens 10mM Koffein oder 1mg/ml Kongorot zeigt der Stamm, der für die kodierende Sequenz der GAP-Domäne deletiert ist, ein vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp oder zum Stamm, der die vollständige *lrg1*-Deletion trägt. Bei steigenden Konzentrationen von Kongorot (2mg/ml) zeigt sich im Gegensatz dazu, daß die vollständige *lrg1*-Deletion im Vergleich zum Wildtyp resistenter ist.



### 3.1.2.6 Sporulation homozygoter $\Delta lrg1/\Delta lrg1$ -Stämme

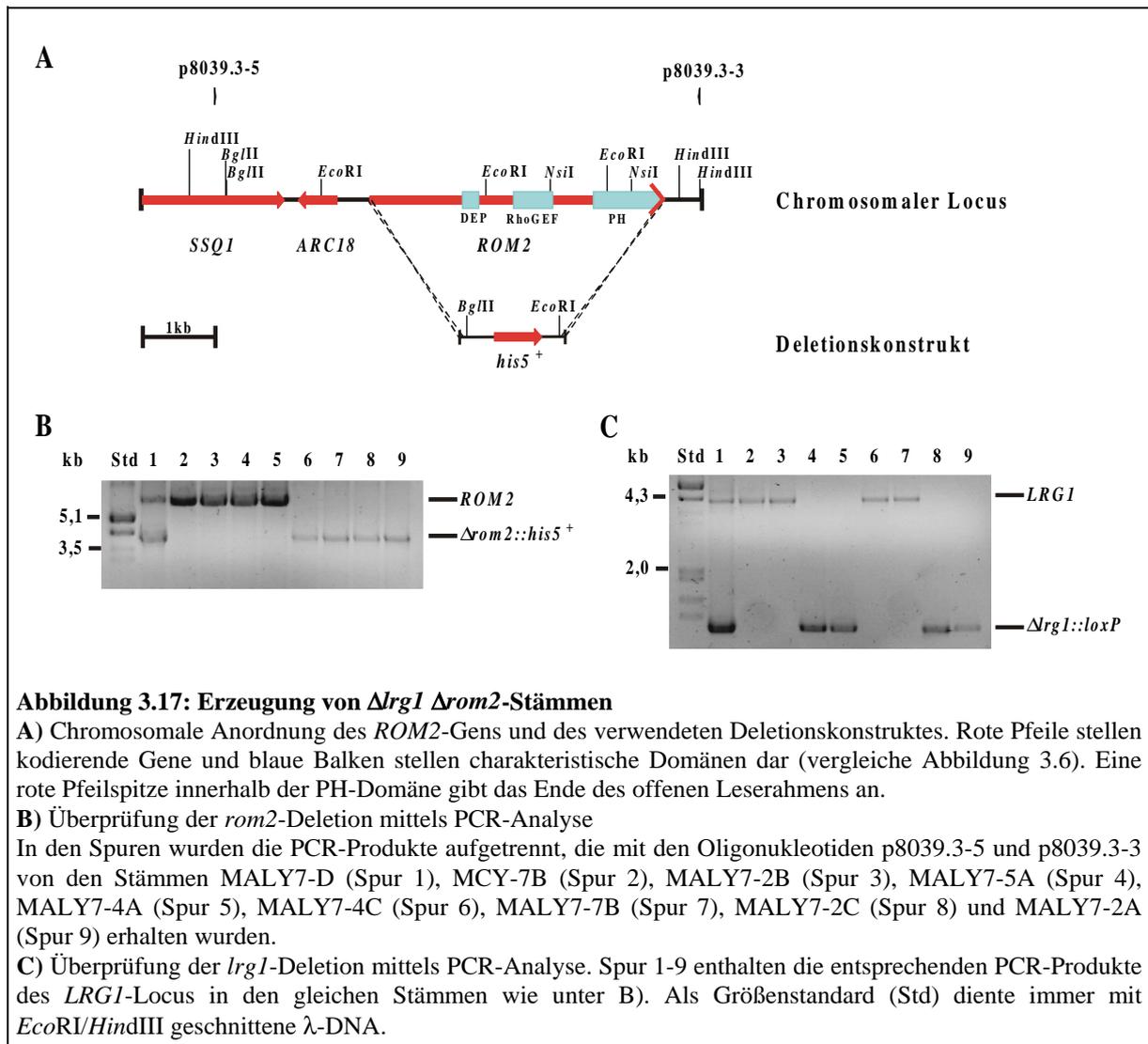
Von Müller *et al.* (1994) wurde gezeigt, daß *LRG1* verstärkt während der Sporulation exprimiert wird. Um zu testen, ob das *LRG1*-Gen eine essentielle Funktion bei der Sporulation besitzt, wurde der Stamm CALY3-D sporuliert. Dieser Stamm zeigte eine gute Sporulationsfähigkeit. Außerdem zeigte eine anschließende Tetradenanalyse, daß von 10 gelegten Tetraden 39 Sporen auskeimten. So zeigte dieser Stamm neben einer guten Sporulationsfähigkeit auch eine gute Lebensfähigkeit seiner Segreganten.

### 3.1.2.7 Deletion von *LRG1* in verschiedenen Pkc1p-Weg-Mutanten

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Deletion von *LRG1* die Phänotypen der *ubk1(rom2)*-Mutanten supprimieren kann. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte nun getestet werden, ob die Deletion von *LRG1* zu einer allgemeinen Suppression von Pkc1p-Weg-Mutanten führt, oder ob es sich um einen spezifischen, supprimierenden Effekt für Mutanten in Komponenten handelt, die oberhalb von Bck1p wirken. Dazu wurden in dem unter 3.1.2.4 erzeugten Stamm MALY2-D (*LRG1*/ $\Delta lrg1::loxP$ ) verschiedene Gene des Pkc1p-Weges deletiert bzw. das *LRG1*-Gen wurde in Pkc1p-Weg-Mutanten deletiert.

3.1.2.7.1 Erzeugung von  $\Delta lrg1 \Delta rom2$  – Mutanten

Es wurde bereits gezeigt, daß die Deletion von *LRG1* sehr effizient eine Mutante supprimieren kann, die ein verkürztes Rom2-Protein exprimiert. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Deletion von *LRG1* die Phänotypen einer vollständigen *rom2*-Deletion supprimieren kann. Dazu wurde in dem für das *LRG1*-Gen heterozygoten Stamm MALY2-D das *ROM2*-Gen mit dem *Sphis5<sup>+</sup>*-Gen wie unter 2.2.2.1 beschrieben, deletiert. Dieser Stamm wurde mit MALY7-D bezeichnet. Nach einer Tradenanalyse lagen verschiedene Kombinationen der Deletionen vor, die zuerst mittels PCR überprüft wurden (Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.17: Erzeugung von  $\Delta lrg1 \Delta rom2$ -Stämmen**

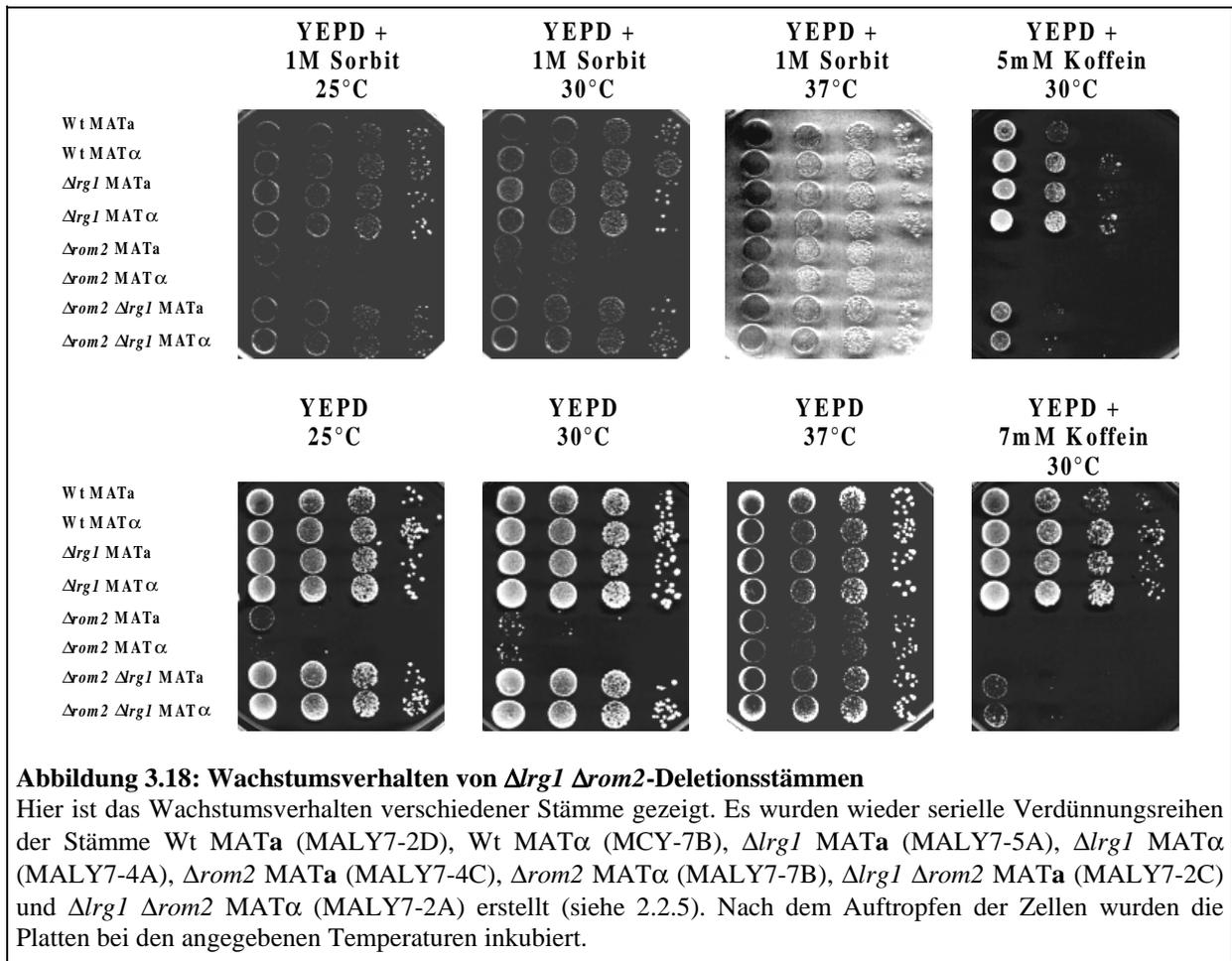
**A)** Chromosomale Anordnung des *ROM2*-Gens und des verwendeten Deletionskonstruktes. Rote Pfeile stellen kodierende Gene und blaue Balken stellen charakteristische Domänen dar (vergleiche Abbildung 3.6). Eine rote Pfeilspitze innerhalb der PH-Domäne gibt das Ende des offenen Leserahmens an.

**B)** Überprüfung der *rom2*-Deletion mittels PCR-Analyse

In den Spuren wurden die PCR-Produkte aufgetrennt, die mit den Oligonukleotiden p8039.3-5 und p8039.3-3 von den Stämmen MALY7-D (Spur 1), MCY-7B (Spur 2), MALY7-2B (Spur 3), MALY7-5A (Spur 4), MALY7-4A (Spur 5), MALY7-4C (Spur 6), MALY7-7B (Spur 7), MALY7-2C (Spur 8) und MALY7-2A (Spur 9) erhalten wurden.

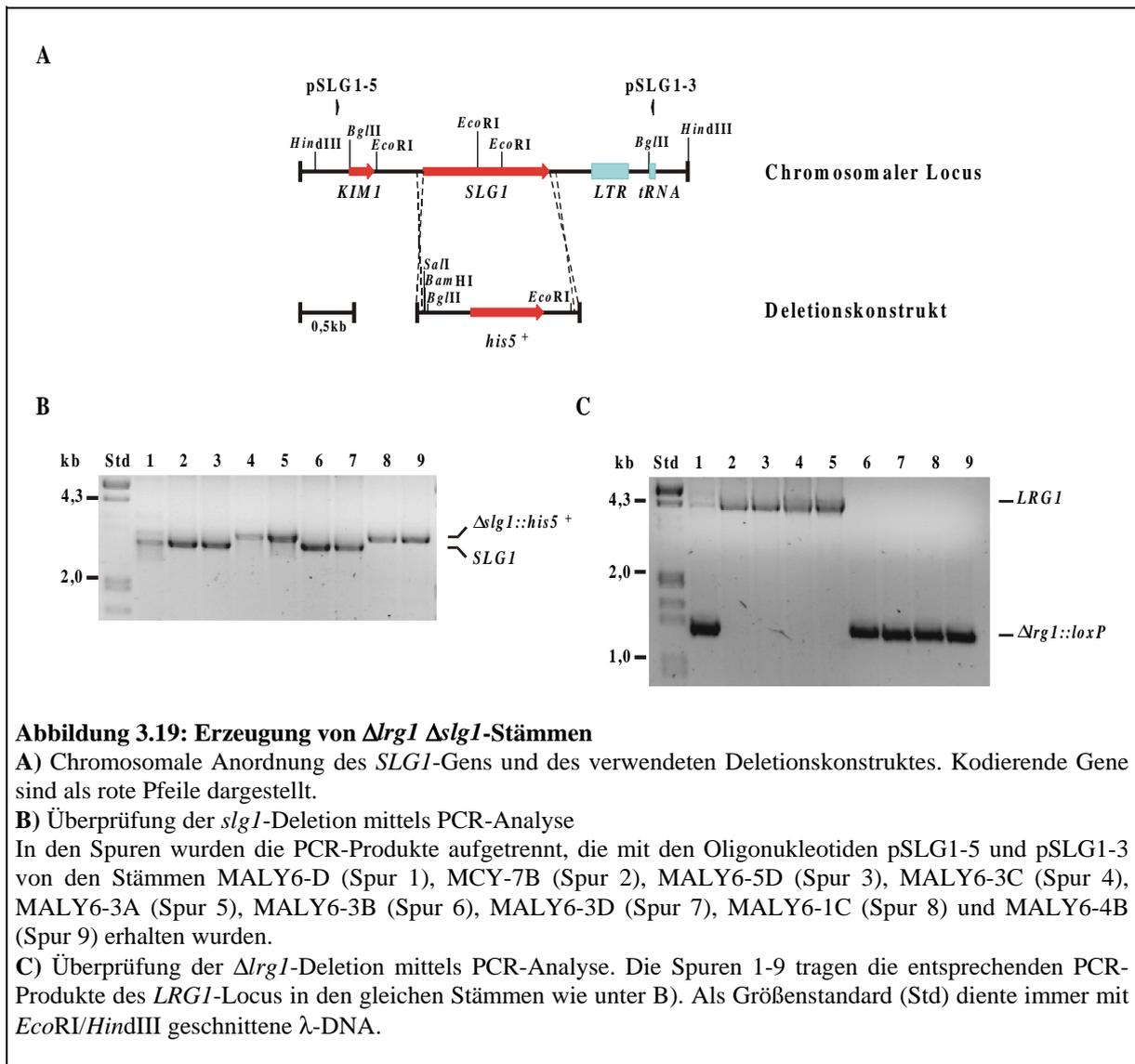
**C)** Überprüfung der *lrg1*-Deletion mittels PCR-Analyse. Spur 1-9 enthalten die entsprechenden PCR-Produkte des *LRG1*-Locus in den gleichen Stämmen wie unter B). Als Größenstandard (Std) diente immer mit *EcoRI/HindIII* geschnittene  $\lambda$ -DNA.

Die erhaltenen Stämme wurden dann auf ihr Wachstumsverhalten unter verschiedenen Bedingungen getestet (Abbildung 3.18). Es zeigte sich, daß die zusätzliche Deletion von *LRG1* in einem *rom2*-Deletionsstamm diesem wieder die Fähigkeit vermittelt, auf Medium ohne osmotische Stabilisatoren bei Temperaturen von 25°C bis 37°C zu wachsen. Auch auf Medium mit Sorbit scheint das Wachstum verbessert, sogar in Anwesenheit von Koffein ist wieder ein schwaches Wachstum sichtbar. Damit ist die Suppression auch vollständiger *rom2*-Deletionen in *lrg1*-Deletionsstämmen gezeigt.

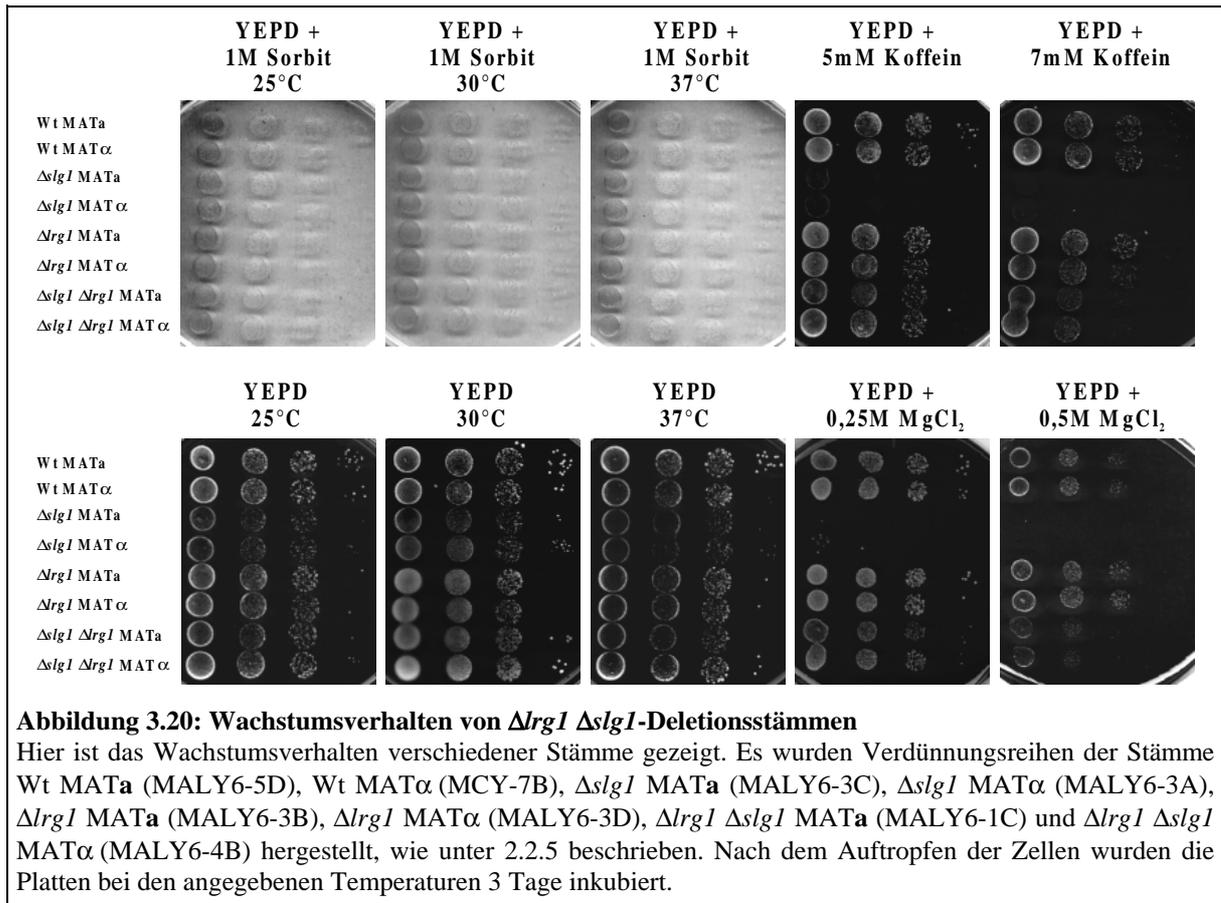


### 3.1.2.7.2 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta slg1$ – Mutanten

Um zu untersuchen, ob die Deletion des *LRG1*-Gens auch die Phänotypen einer *slg1*-Deletion supprimieren kann, wurde der Stamm MALY6-D konstruiert. *SLG1* kodiert für einen möglichen Zellwandsensor und agiert oberhalb der MAP-Kinase-Kaskade (siehe auch 1.1.1.4; Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998). Dazu wurde in dem Stamm MALY2-D (*LRG1*/ $\Delta lrg1::loxP$ ) das *SLG1*-Gen mit dem *his5*<sup>+</sup>-Gen aus *S.pombe* deletiert, wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Nach Sporulation und anschließender Tetradenanalyse wurden entsprechende Sporen mittels PCR auf die korrekte Deletion überprüft (Abbildung 3.19).



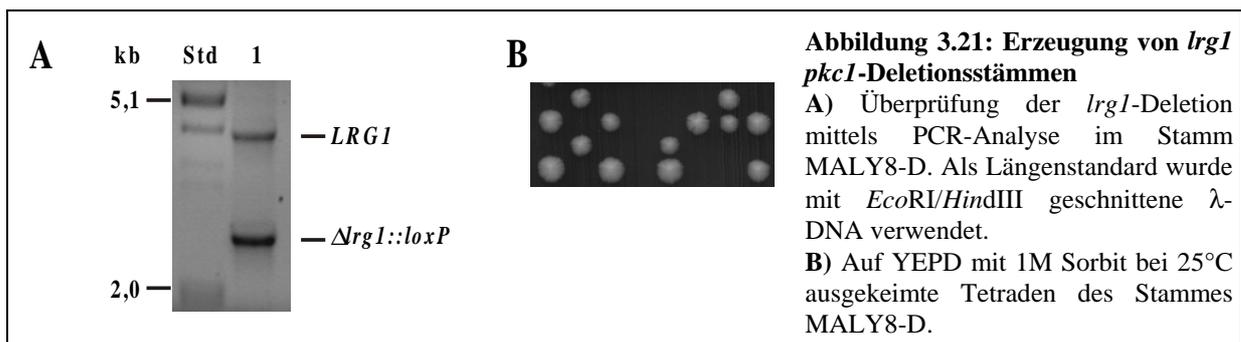
Mutanten die für das *SLG1*-Gen, das *LRG1*-Gen oder beide Gene deletiert sind, wurden auf ihr Wachstum unter verschiedenen Bedingungen getestet (Abbildung 3.20). Dabei hebt die Deletion von *LRG1* die Koffein-Sensitivität der  $\Delta slg1$ -Mutanten ebenso auf, wie die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Magnesiumchlorid.



Hieraus ergibt sich, daß die Deletion von *LRG1* nicht nur *rom2*-Mutanten supprimieren kann, sondern auch  $\Delta slg1$ -Mutanten.

### 3.1.2.7.3 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta pkc1$ – Mutanten

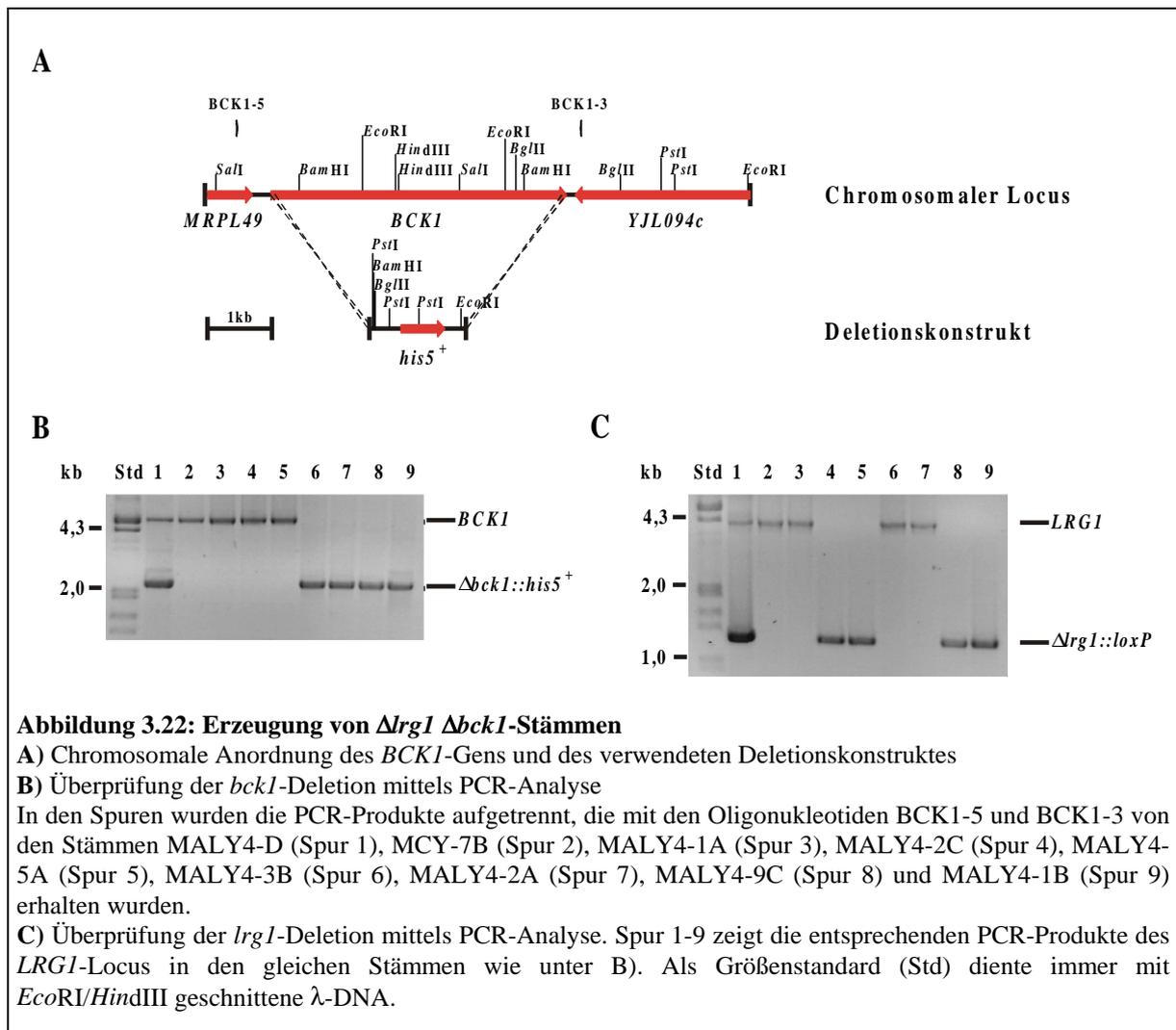
Schmitz (1997) und Jacoby (1997) zeigten bereits, daß die Deletion des *PKC1*-Gens in dem verwendeten Wildtyp-Stamm HD56-5A bzw. MCY-7B letal ist. Auch das Zuführen osmotischer Stabilisatoren kann entsprechenden Deletionsmutanten kein Wachstum ermöglichen. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die Deletion des *LRG1*-Gens die Letalität von *pkc1*-Deletionen aufheben kann. Dazu wurde in dem Stamm MCY-23D (*PKC1*/ $\Delta pkc1$ ) das *LRG1*-Gen mit der *loxP*-*KanMX*-*loxP*-Deletionskassette ersetzt. Die PCR-Analyse ist in Abbildung 3.21A gezeigt. Der entstandene, diploide Stamm MALY8-D zeigt zum einen die Wildtyp-Bande des *LRG1*-Gens von 4,2kb, zum anderen eine Bande von 2,8bp als Nachweis des *lrg1::KanMX*-Deletionsallels und ist damit heterozygot für das *LRG1*- und das *PKC1*-Gen.



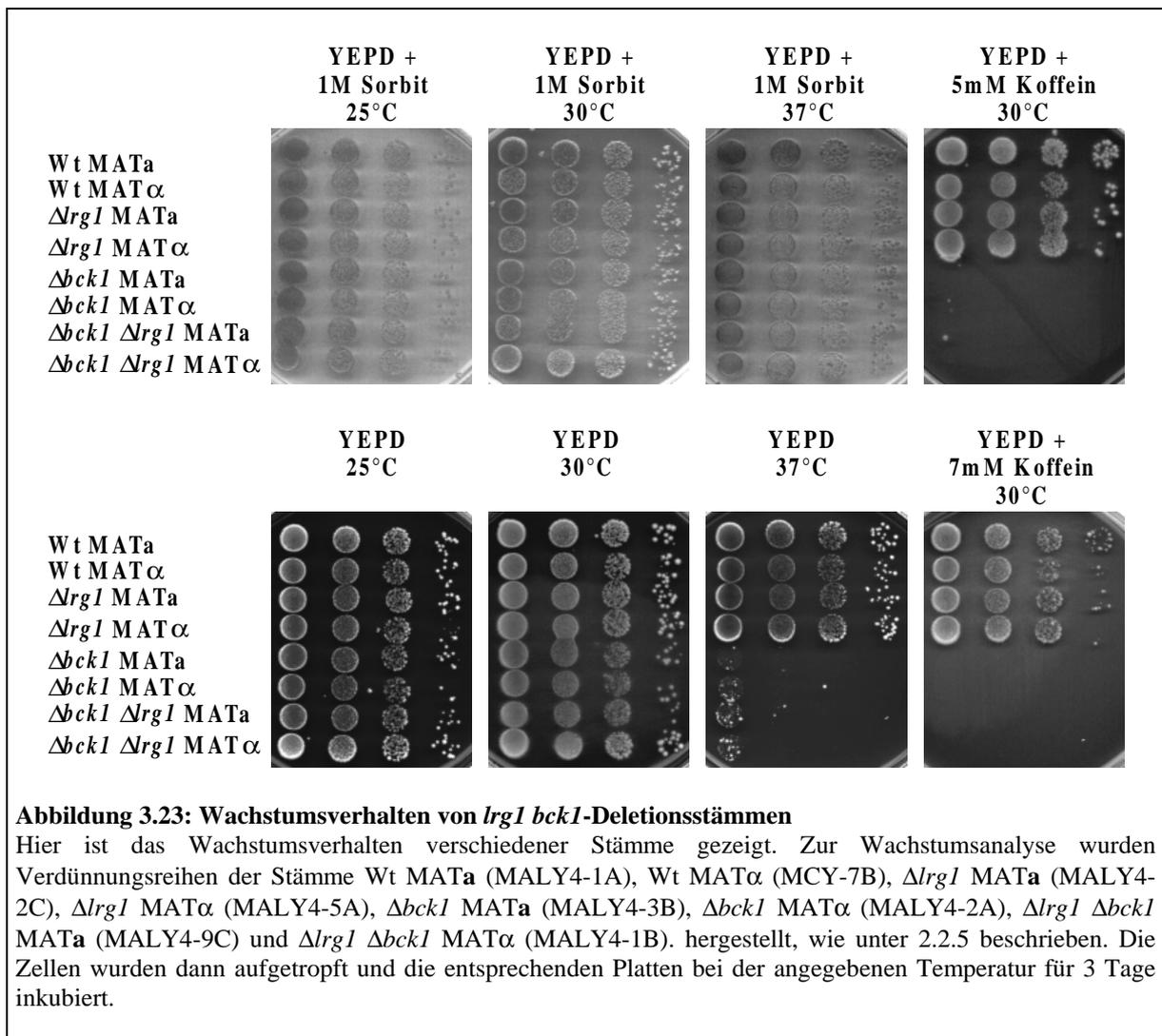
Der Stamm MALY8-D wurde sporuliert und einer Tetradenanalyse unterzogen. Ein typisches Bild der ausgekeimten Sporen zeigt Abbildung 3.21B. Nur maximal 2 Sporen keimten aus. Ein solches Verhalten ist für Deletionen charakteristisch, die einen letalen Phänotyp hervorrufen. Eine Überprüfung der prototrophen Marken der lebensfähigen Sporen zeigte, daß keine Histidin-prototrophen Sporen unter den lebensfähigen Sporen war (Daten nicht gezeigt). Diese Tetradenanalyse macht deutlich, daß die Deletion von *LRG1* die Letalität einer *pkc1*-Deletionsmutanten in den von uns verwendeten Stämmen nicht aufheben kann.

#### 3.1.2.7.4 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta bck1$ - Mutanten

Um zu untersuchen, ob die Deletion des *LRG1*-Gens auch die Phänotypen einer  $\Delta bck1$ -Mutanten supprimiert, wurde in dem diploiden, für die *lrg1*-Deletion heterozygoten Stamm MALY2-D das *BCK1*-Gen mit dem *Sphis5<sup>+</sup>*-Marker, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, deletiert. *BCK1* kodiert für die MAP-Kinase-Kinase-Kinase des Zellintegritätsweges und agiert unterhalb von Pkc1p. Die korrekte Deletion von *BCK1* und *LRG1* in dem diploiden Stamm und den entsprechenden Sporen wurde mittels PCR überprüft und der resultierende Stamm mit MALY4-D bezeichnet (Abbildung 3.22). Nach Sporulation und anschließender Tetradenanalyse zeigte sich, daß sowohl der Lysephänotyp als auch die Koffeinsensitivität 2:2 segregierten. Die Überprüfung der Segreganten mittels PCR zeigt Abbildung 3.22.



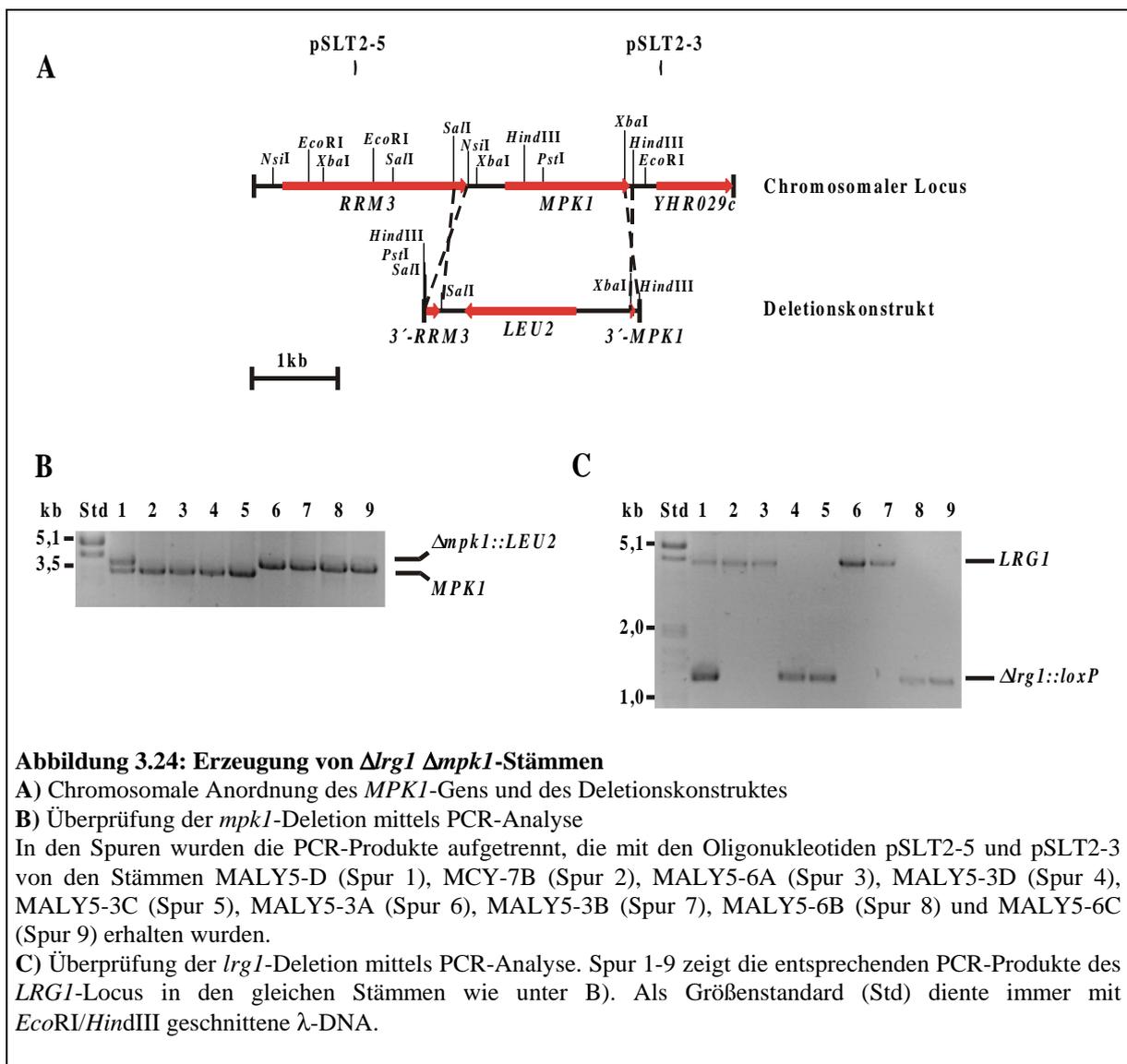
Die anschließende Wachstumsanalyse (Abbildung 3.23) der Segreganten zeigte, daß sich die *bck1*-Deletion in ihrem Wachstum nicht von der Doppelmutante  $\Delta bck1 \Delta lrg1$  unterscheidet. Sowohl die  $\Delta bck1$ -Mutante, als auch die  $\Delta lrg1 \Delta bck1$ -Doppelmutante sind nicht in der Lage ohne Zugabe von Sorbit bei 37°C oder in Anwesenheit von Koffein zu wachsen.



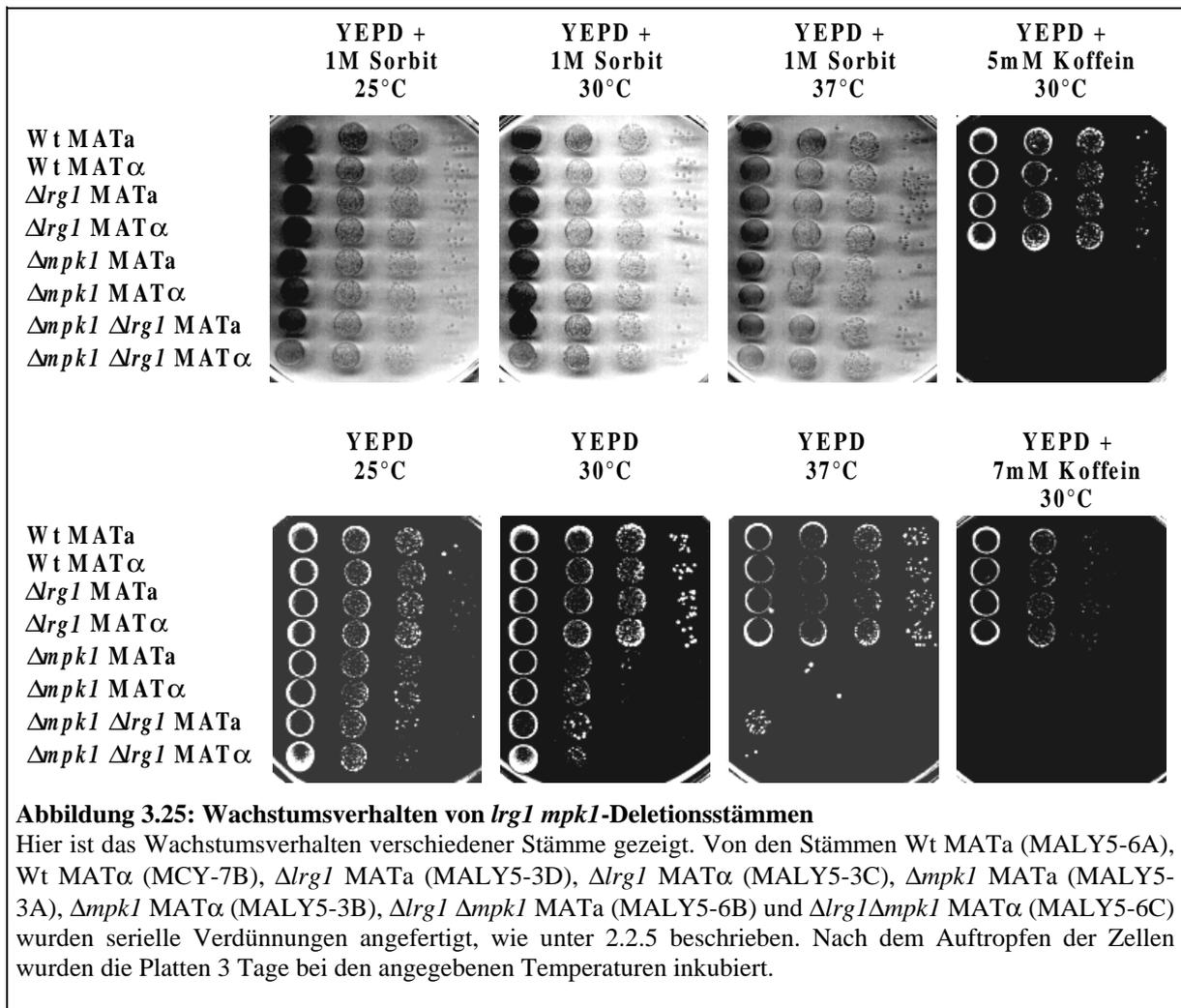
Damit reicht die *lrg1*-Deletion nicht aus, um Phänotypen einer *bck1*-Deletion zu supprimieren.

#### 3.1.2.7.5 Erzeugung von $\Delta lrg1 \Delta mpk1$ - Mutanten

*MPK1* ist das für die MAP-Kinase kodierende Gen (Lee *et al.*, 1993). Um zu untersuchen, ob die Deletion des *LRG1*-Gens die Phänotypen einer  $\Delta mpk1$ -Mutanten supprimieren kann, wurde der diploide, für die *lrg1*-Deletion heterozygote Stamm MALY2-D mit dem *HindIII*-geschnittenen Deletionsplasmid pCSLT2::LEU2 transformiert. Die korrekte Deletion wurde mittels PCR überprüft und der resultierende Stamm mit MALY5-D bezeichnet (Abbildung 3.24).

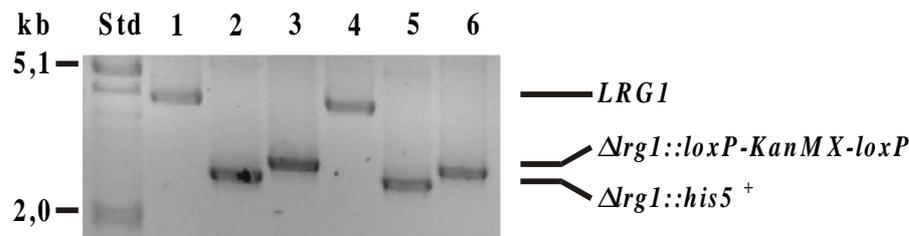


Nach Sporulation und anschließender Tetradenanalyse segregierten der Lysephänotyp und die Koffein-Sensitivität 2:2. Die Wachstumsanalyse einiger ausgewählter Segreganten ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Diese Analysen ergaben, daß die *mpk1*-Deletion in ihrem Wachstum nicht von der Doppelmutante  $\Delta mpk1 \Delta lrg1$  zu unterscheiden ist. Die  $\Delta mpk1$ -Mutanten sind nicht in der Lage, ohne Sorbit bei 30°C oder 37°C oder in Anwesenheit von Koffein zu wachsen. Dieser Phänotyp wird auch nicht durch eine zusätzliche Deletion von *LRG1* supprimiert.



### 3.1.2.7.6 Deletion von *LRG1* in einer *rho1*-Mutanten

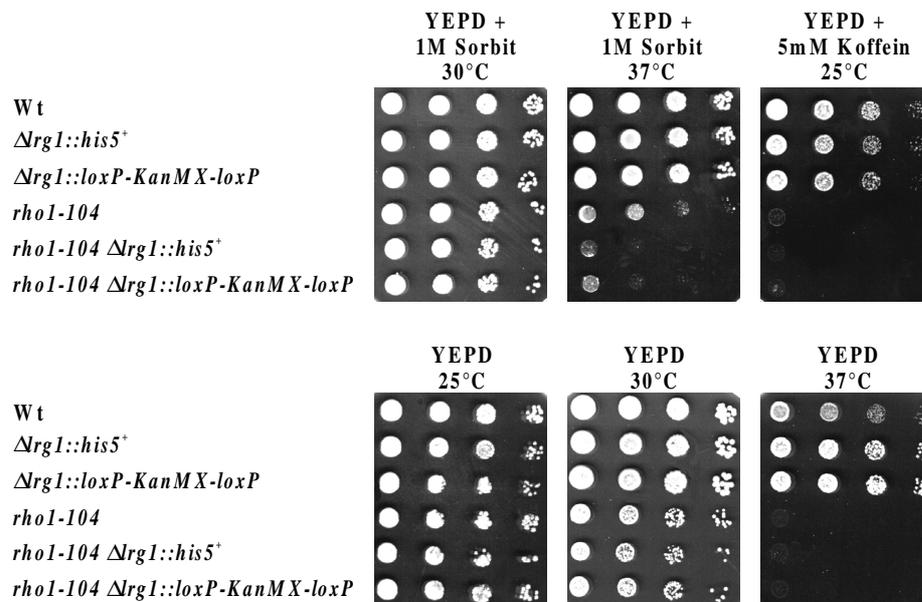
Ein Aktivator der Proteinkinase C ist die kleine GTPase Rho1p in ihrer GTP-gebundenen Form. Die Deletion dieses Proteins ist letal für die Zelle. Daher wurde mit dem Stamm HNY21 gearbeitet, der ein rezessives, Temperatur-sensitives Allel des *RHO1*-Gens (*rho1-104*) trägt (Yamochi *et al.*, 1994). Das *rho1-104*-Allel trägt zwei Mutationen. Zum einen findet sich ein Austausch von Aspartat zu Asparagin an Position 72 hinter einem der beiden Phosphat/  $Mg^{2+}$ -"Bindeloops". Bei der anderen Mutation handelt es sich um einen Austausch von Cystein zu Tyrosin in einer der "Guanin-Bindeschleifen" an Position 164. Welche dieser beiden Mutationen den Phänotyp verursacht, ist jedoch nicht bekannt. Der Stamm HNY21 und der zugehörige Wildtyp-Stamm OHNY1 wurden freundlicherweise von Y.Takai zur Verfügung gestellt. Die *rho1*-Mutante wächst nicht bei erhöhter Temperatur (37°C) ohne osmotische Stabilisatoren. Sie lysiert zum größten Teil als Zelle mit kleiner Knospe. In den Stämmen OHNY1 und HNY21 wurde das *LRG1*-Gen, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, durch das *Sphis5<sup>+</sup>*-Gen bzw. durch das Kanamycin-Resistenzgen ersetzt. Die korrekten Deletionen wurden mittels PCR-Analyse überprüft (Abbildung 3.26).



**Abbildung 3.26: Überprüfung von  $\Delta lrg1$  *rho1-104*-Stämmen mittels PCR-Analyse**

In den Spuren wurden die PCR-Produkte aufgetrennt, die mit den Oligonukleotiden LRG1-5 und LRG1-3 von den Stämmen OHNY1 (Spur 1), HYAL3 (Spur 2), HYAL1 (Spur 3), HNY21 (Spur 4), HYAL4 (Spur 5) und HYAL2 (Spur 6) erhalten wurden. Als Größenstandard (Std) diente mit *EcoRI/HindIII* geschnittene  $\lambda$ -DNA.

Der Stamm OHNY1, der das  $\Delta lrg1::loxP-KanMX-loxP$ - bzw. das  $\Delta lrg1::Sphis5^+$ -Allel trägt, wird im weiteren Verlauf mit HYAL1 bzw. HYAL3 bezeichnet. Der Temperatur-sensitive Stamm HNY21, bei dem das *LRG1*-Gen mit der *KanMX*-Marke bzw. der *Sphis5^+*- Marke deletiert ist, wird HYAL2 bzw. HYAL4 genannt. Abbildung 3.27 zeigt die phänotypische Analyse der Stämme.



**Abbildung 3.27: Wachstumsverhalten von  $\Delta lrg1$  *rho1<sup>ts</sup>*-Stämmen**

Hierfür wurden die Stämme Wt (OHNY1),  $\Delta lrg1::his5^+$  (HYAL3),  $\Delta lrg1::loxP-KanMX-loxP$  (HYAL1),  $\Delta rho1-104$  (HNY21),  $\Delta rho1-104$   $\Delta lrg1::his5^+$  (HYAL4) und  $\Delta rho1-104$   $\Delta lrg1::loxP-KanMX-loxP$  (HYAL2) über Nacht in YEPD mit 1M Sorbit bei 25°C angezogen und Verdünnungsreihen, wie unter 2.2.5 beschrieben, hergestellt. Nach dem Auftropfen auf die verschiedenen Medien wurden die Platten bei den angegebenen Temperaturen für 3 Tage inkubiert.

Die Deletion von *LRG1* ist nicht ausreichend, um die Temperatur-Sensitivität der *rho1-104*-Mutanten bei 37°C zu supprimieren. Die zusätzliche Deletion verstärkt sogar noch den Phänotyp der *rho1-104*-Mutanten bei Wachstum auf Sorbit-haltigem Medium. Auch zeigt sich in diesem Stamm, daß die alleinige Deletion von *LRG1* den Zellen ein verbessertes Wachstum bei erhöhter Temperatur (37°C) auf Platten ohne osmotische Stabilisatoren im Vergleich zum Wildtyp verleiht.

3.1.2.7.7 Tabellarische Zusammenfassung der Suppressionswirkung von *lrg1*-Deletionen

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der durchgeführten Suppressionsstudie nochmals zusammengefaßt.

Mutante	Suppression durch Deletion von <i>LRG1</i>
<i>ubk1 (rom2-ΔPH-Domäne)</i>	+
<i>Δrom2</i>	+
<i>rho1-104</i>	-
<i>Δslg1</i>	+
<i>Δpkc1</i>	-
<i>Δbck1</i>	-
<i>Δmpk1</i>	-

**Tabelle 3.4:** Ergebnisse der Suppressionsanalysen aus den Kapiteln 3. 3.1.2.7.1-3.1.2.7.6

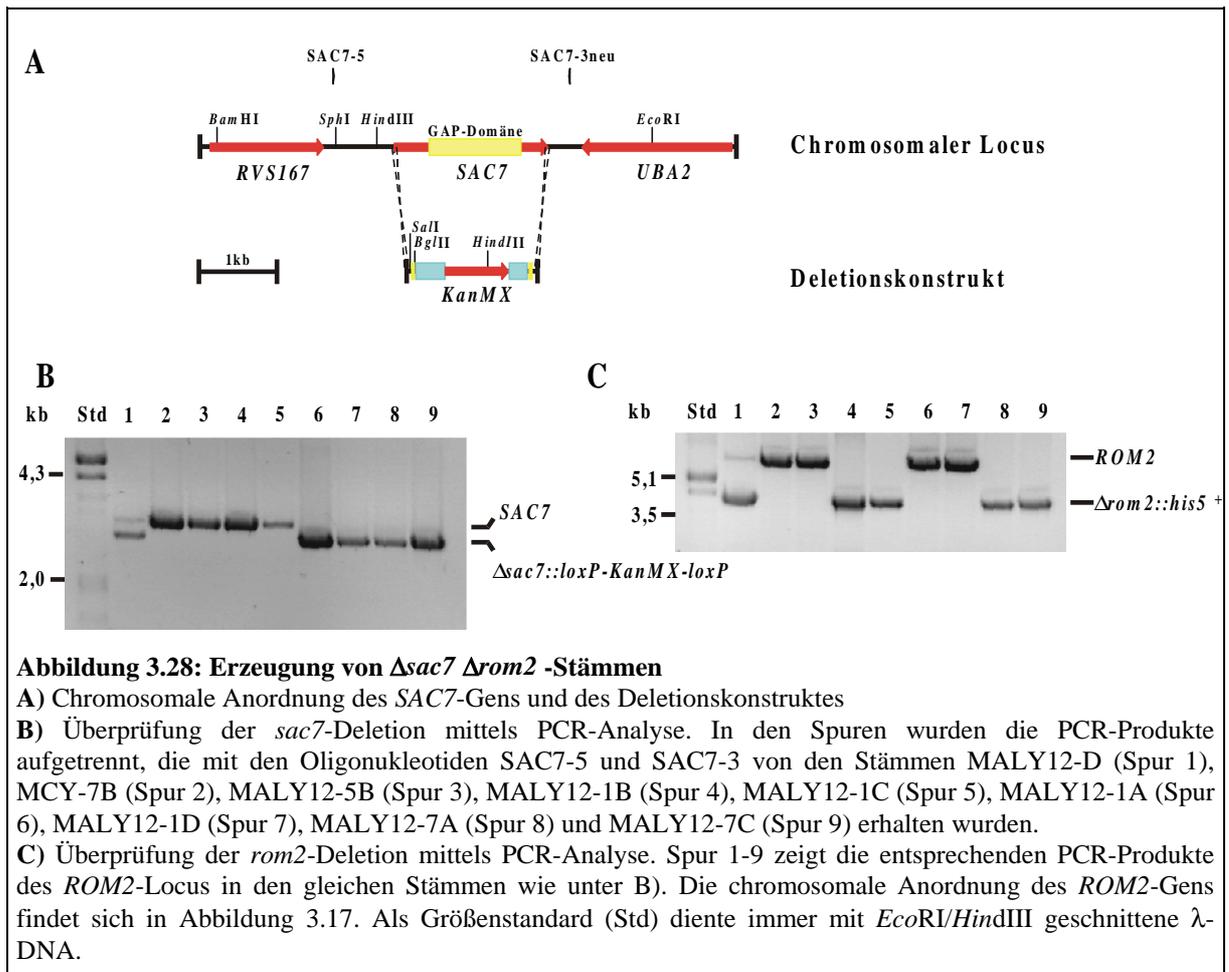
Abschließend läßt sich festhalten, daß die Deletion von *LRG1* nur Mutanten in Komponenten des Pkc1p-Weges supprimieren kann, für die eine Funktion oberhalb des Pkc1-Proteins postuliert wurde.

### 3.1.2.8 Deletion der für GTPase-aktivierende Proteine-kodierenden Gene *SAC7*, *BEM2* und *BAG7* in einer *Δrom2*-Mutanten

*LRG1* läßt sich aufgrund seiner Homologie einer Gruppe von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) zuordnen, zu denen auch Sac7p, Bag7p, Bem2p, Bem3p, Rga1p, Rga2p und Rgd1p gehören. Für Bem3p und Rga1p war die GTPase-aktivierende Funktion für Cdc42p nachgewiesen (Zheng *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1994; Stevenson *et al.*, 1995), während für Rga2p die Funktion unklar ist und Rgd1p als GAP für Rho3p und Rho4p beschrieben ist (Doignon *et al.*, 1999). Aufgrund seiner Homologie zu diesen Proteinen und den bisherigen Suppressionsstudien lag die Vermutung nahe, daß Lrg1p als weiteres GTPase-aktivierendes Enzym auch auf Rho1p oder sein Homologes Rho2p wirkt. Da für Rho1p schon die Proteine Sac7p und Bem2p als GAP's bekannt waren, wurde überprüft, ob die Deletionen dieser beiden Gene auch zu einer Suppression des osmo- und Koffein-sensitiven Phänotyps einer *rom2*-Deletionsmutanten führt. Für die Deletion von *SAC7* war eine Suppression bereits beschrieben (Schmidt *et al.*, 1997). Dies sollte für unseren Stamm noch einmal bestätigt werden, da wie unter 3.1.1.9 erwähnt, manchmal große Unterschiede im Wachstumsverhalten verschiedener Stämmen liegen können. Neben *SAC7* und *BEM2* war bekannt, daß das *BAG7*-Gen den kälte-sensitiven Phänotyp einer *sac7*-Deletion vollständig supprimiert (Schmidt *et al.*, 1997). Einige Befunde deuteten auch darauf hin, daß Bag7p ein weiteres GAP für Rho1p sein könnte (Schmidt und Hall, 1998). Die Bedeutung dieser Gene sollte im Folgenden näher untersucht werden

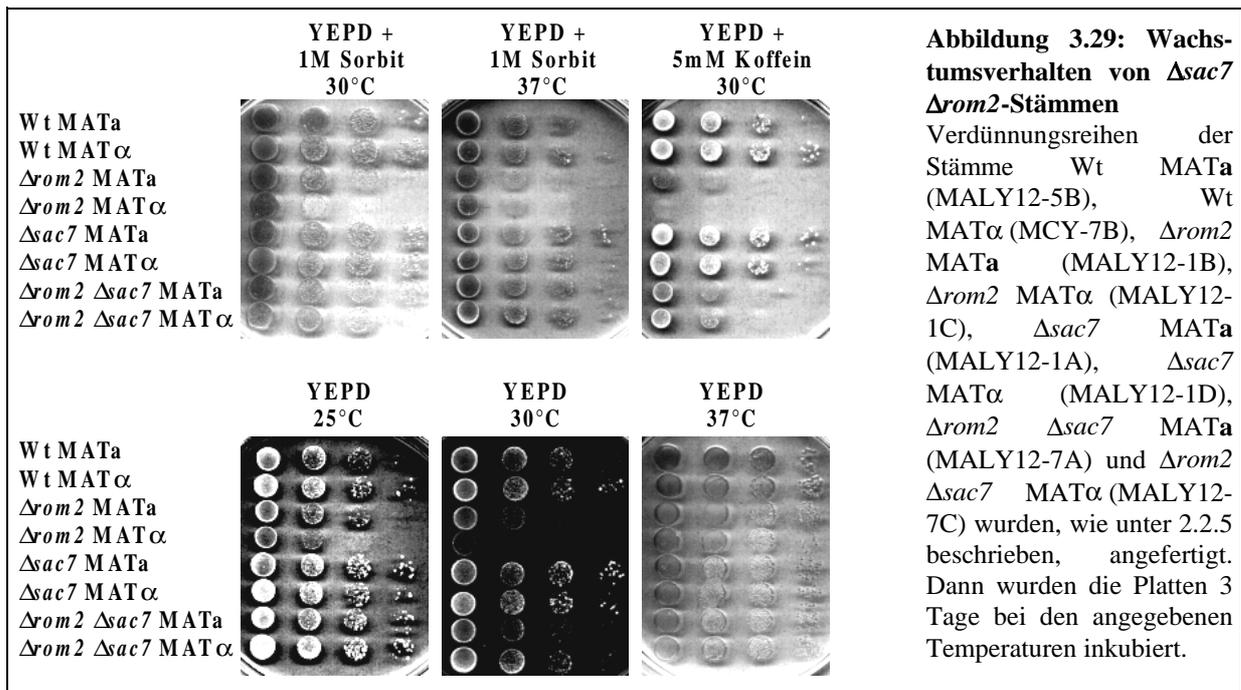
#### 3.1.2.8.1 Erzeugung von *sac7 rom2*-Doppeldeletionsmutanten

Zur Erzeugung von *Δrom2 Δsac7*-Mutanten wurde in dem Stamm MCY-22D das *ROM2*-Gen mit dem *his5<sup>+</sup>*-Gen aus *S.pombe* wie unter 2.2.2.1 beschrieben, deletiert. Dieser Stamm wurde MALY9-D genannt. Hierin wurde zusätzlich das *SAC7*-Gen durch das *loxP-KanMX-loxP*-Deletionskonstrukt ersetzt (siehe 2.2.2.1). Der für das *ROM2*- und das *SAC7*-Gen heterozygote Stamm wurde mit MALY12-D bezeichnet. Eine Tetradenanalyse erbrachte Sporen mit den gewünschten Deletionskombinationen. Eine Auswahl von Stämmen wurde mittels PCR überprüft (Abbildung 3.28).



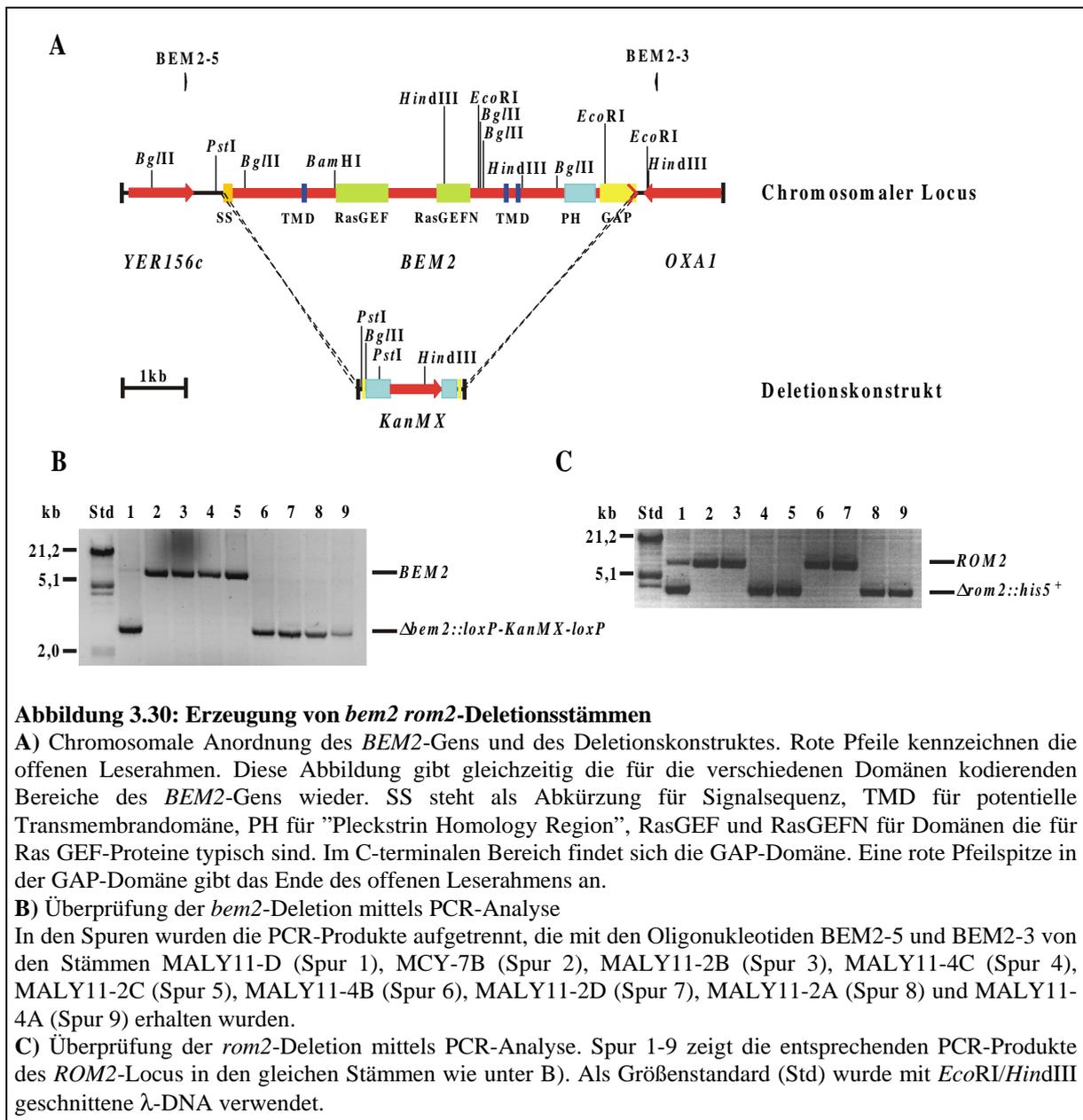
Die verschiedenen Deletionsstämme wurden auf ihr Wachstum unter verschiedenen Bedingungen getestet (Abbildung 3.29).

Die Wachstumsanalyse zeigt, daß die zusätzliche Deletion von *SAC7* einer  $\Delta rom2$ -Mutanten das Wachstum auf Sorbit-freiem Medium, insbesondere bei 25°C und bei 30°C ermöglicht, und sogar die Koffein-Sensitivität der *rom2*-Mutanten schwach supprimieren kann. In bezug auf die Suppressionsfähigkeit einer  $\Delta rom2$ -Mutanten verhält sich also die  $\Delta sac7$ -Mutation wie die  $\Delta lrg1$ -Mutation.

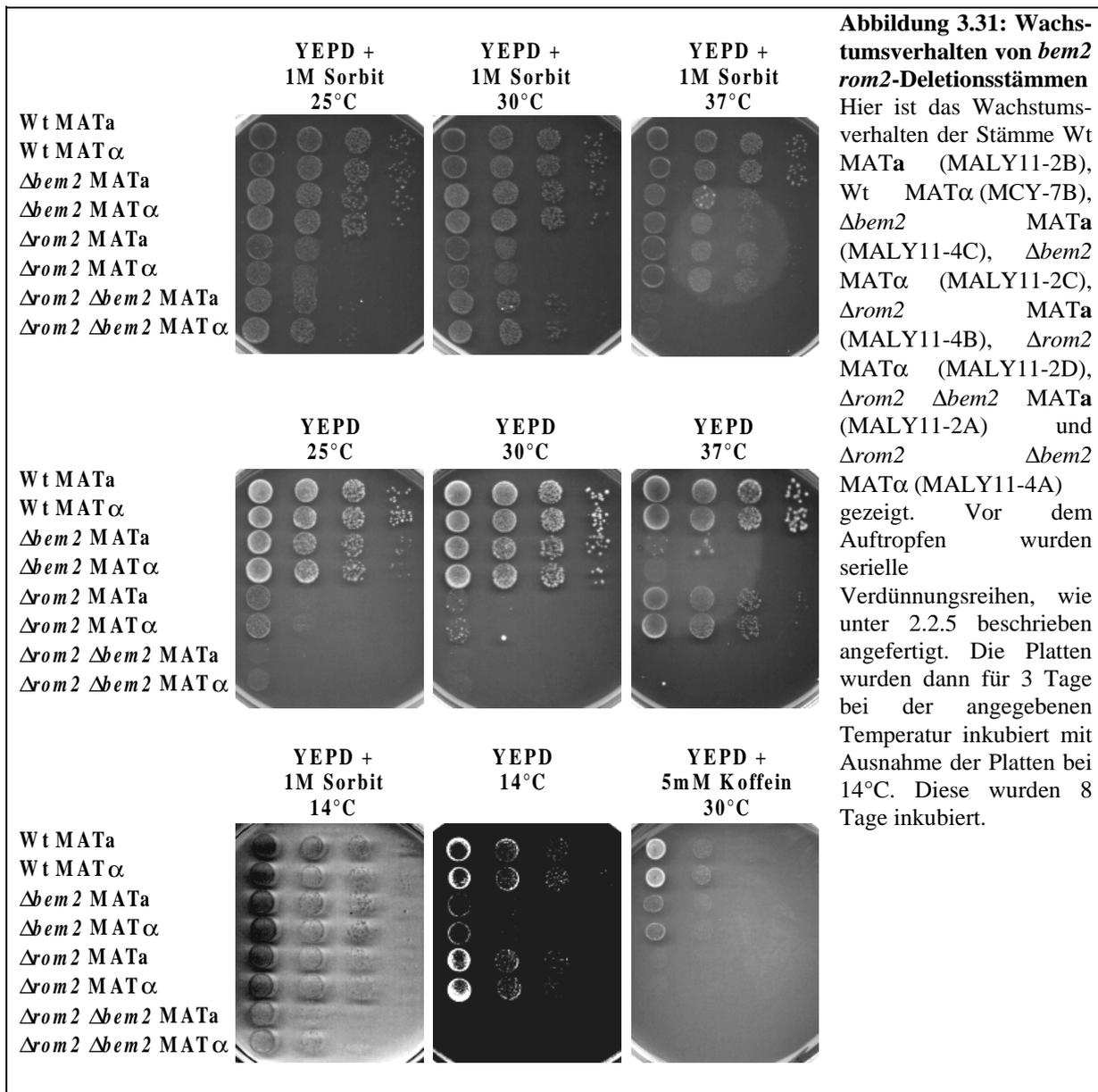


### 3.1.2.8.2 Erzeugung von *bem2 rom2*-Doppeldeletionsmutanten

Ein weiteres auf Rho1p wirkendes GTPase-aktivierendes Protein wird von dem *BEM2*-Gen kodiert. Bisher lagen keine Daten vor, die gezeigt hätten, daß die zusätzliche Deletion von *BEM2* einer  $\Delta rom2$ -Mutanten wieder ein Wachstum ohne osmotische Stabilisatoren ermöglicht. Um dies zu untersuchen, wurde in dem Stamm MALY9-D (*ROM2*/ $\Delta rom2$ ::*Sphis5*<sup>+</sup>) das *BEM2*-Gen mit der *loxP-KanMX-loxP*-Kassette ersetzt. Es resultierte der heterozygote Stamm MALY11-D. Nach Sporulation, einer Tetraden-Analyse und einer PCR-Überprüfung der Deletionsallele (Abbildung 3.30) wurden verschiedene Deletionsstämme auf ihr Wachstum untersucht (Abbildung 3.31).

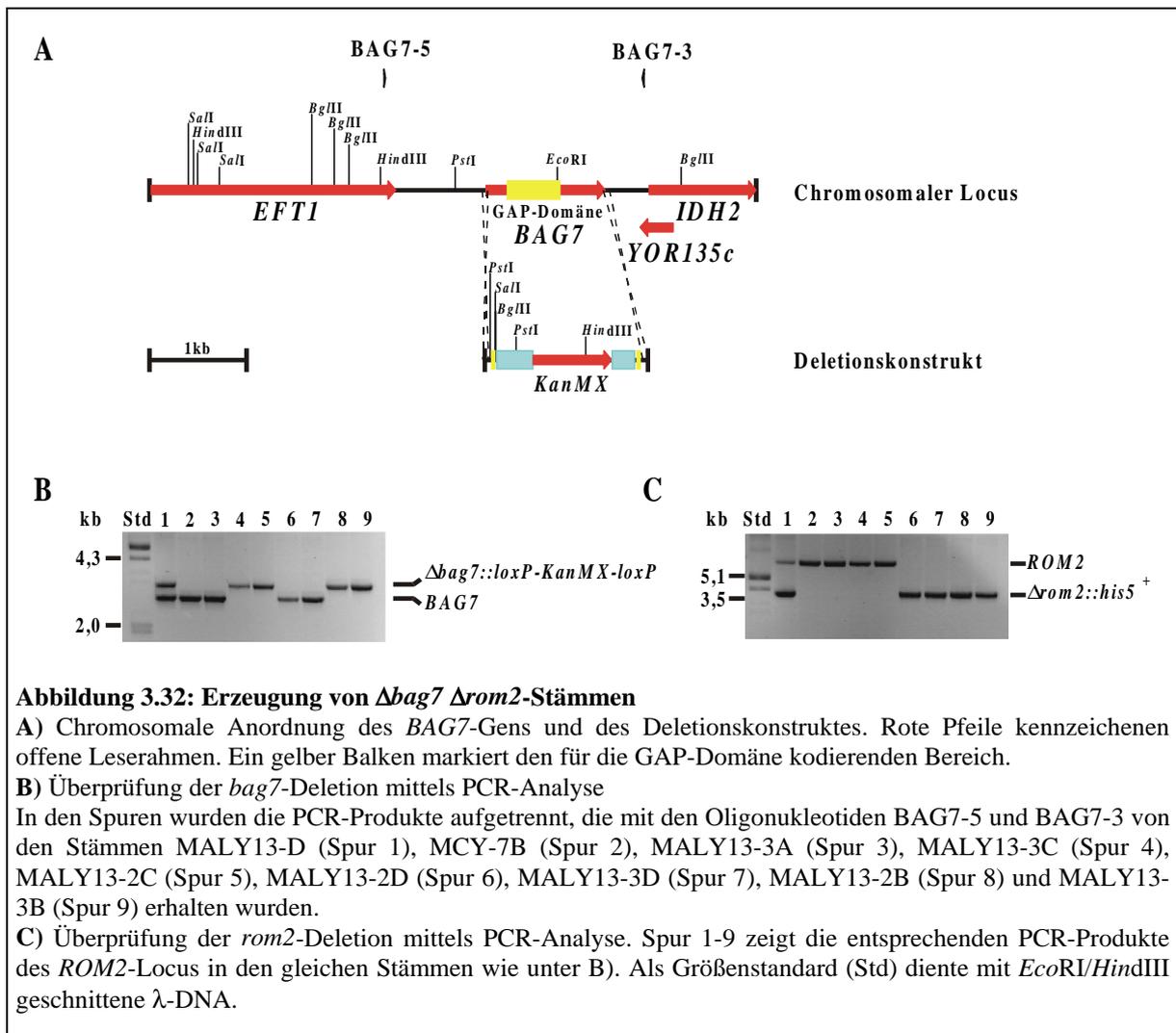


Die Wachstumsanalyse ergab, daß *bem2*-Deletionstämmen einen Lyse-Phänotyp bei 14°C und bei 37°C zeigen, d.h. Mutanten sind nicht in der Lage bei diesen Temperaturen ohne osmotische Stabilisatoren zu wachsen. Außerdem zeigt dieser Stamm eine leichte Koffeinsensitivität im Vergleich zum Wildtyp. Im Gegensatz dazu ist die  $\Delta rom2$ -Mutante sehr wohl in der Lage, bei 14°C und 37°C ohne osmotische Stabilisatoren zu wachsen. Sie verhält sich genau entgegengesetzt zur  $\Delta bem2$ -Mutante. Die gleichzeitige Deletion von *BEM2* und *ROM2* führt zu einem verstärkten Wachstumsdefekt im Vergleich zu den Einfachmutanten. So ist die Doppelmutante nicht mehr in der Lage bei 37°C, trotz Zugabe von 1M Sorbit, zu wachsen. Gleiches gilt auch für ihr Wachstum bei 14°C. Es ist also ersichtlich, daß im Gegensatz zur Deletion von *LRG1* oder *SAC7*, die die Wachstumsphänotypen von  $\Delta rom2$ -Mutanten unterdrücken, die *BEM2*-Deletion die Wachstumsdefekte von  $\Delta rom2$ -Mutanten verstärkt. Dies ist ein sehr überraschendes Ergebnis, da ein solches Verhalten eher bei Genen auftritt, denen ähnliche Funktionen zukommen.

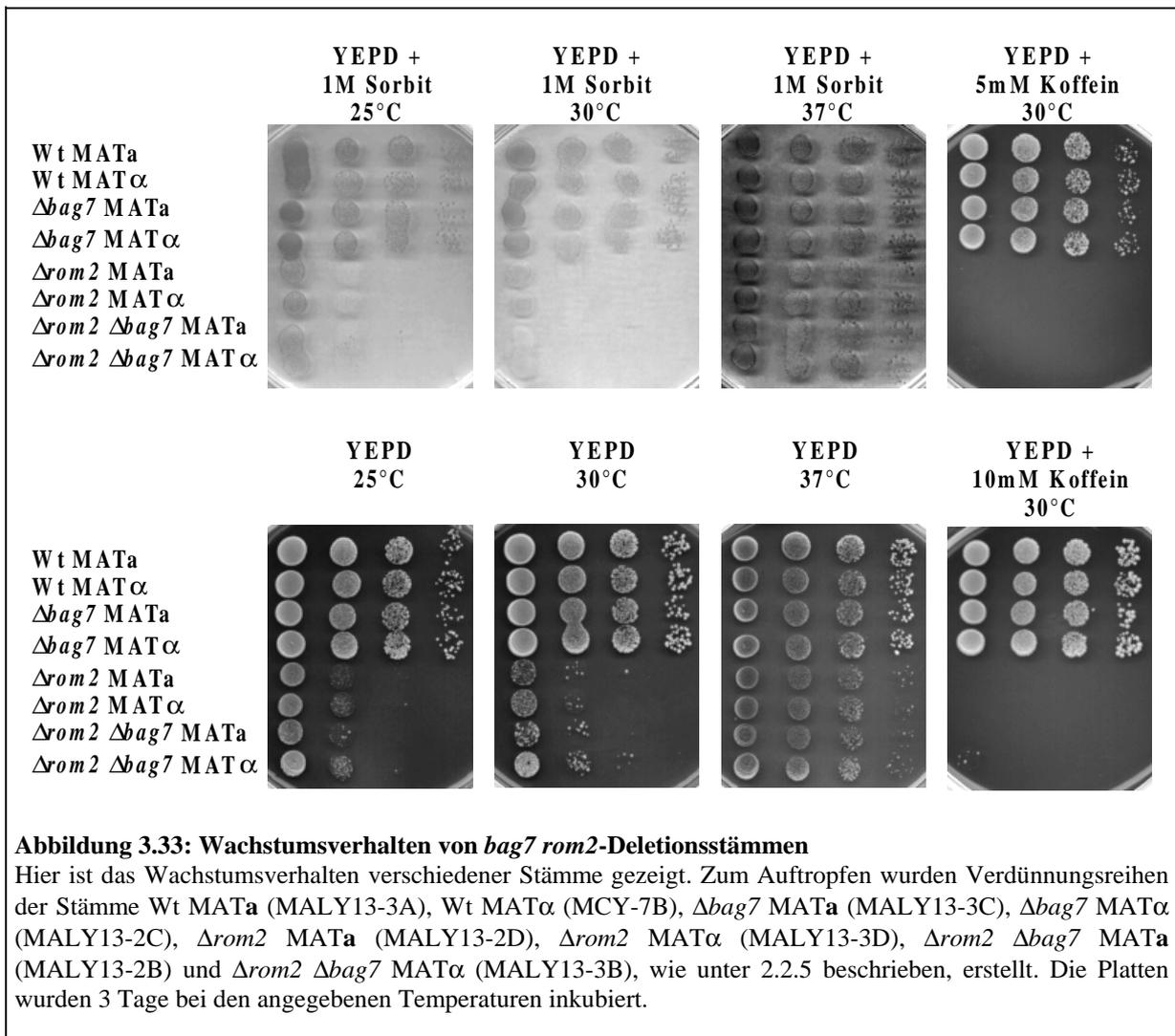


### 3.1.2.8.3 Erzeugung von *bag7 rom2*-Doppeldeletionsmutanten

*BAG7* kodiert auch für ein GTPase-aktivierendes Protein. Von Schmidt *et al.* (1997) wurde bereits beschrieben, daß das *BAG7*-Gen die Kälte-Sensitivität einer *Δsac7*-Mutante komplementiert. Ferner hat diese Arbeitsgruppe Hinweise, daß Bag7p auch auf Rho1p wirkt (Schmidt und Hall, 1998). Daher sollte hier weiter untersucht werden, ob die Deletion von *BAG7* auch Wachstumsdefekte von *Δrom2*-Mutanten komplementieren kann. Dazu wurde in dem Stamm MALY9-D (*ROM2/Δrom2::Sphis5<sup>+</sup>*) das *BAG7*-Gen mit der *loxP-KanMX-loxP*-Deletionskassette ersetzt. Der resultierende Stamm wurde mit MALY13-D bezeichnet. Die anschließende Tetraden-Analyse erbrachte Sporen mit den gewünschten Deletionskombinationen. Die PCR-Überprüfung dieser Stämme findet sich in Abbildung 3.32.



Die verschiedenen Stämme wurden wieder auf ihr Wachstumsverhalten untersucht (Abbildung 3.33). Die gleichzeitige Deletion von *BAG7* veränderte dabei das Wachstumsverhalten von  $\Delta rom2$ -Mutanten nicht. Die  $\Delta bag7 \Delta rom2$ -Mutanten zeigen ein identisches Wachstum zu den  $\Delta rom2$ -Einfachmutanten. Beide Mutanten wachsen schlechter auf Medium mit und ohne Sorbit bei 25°C und bei 30°C und zeigen einen Koffein-sensitiven Phänotyp. Die  $\Delta bag7$ -Einfachmutante dagegen wächst wie der Wildtyp und weist keinen Wachstumsdefekt unter den hier getesteten Bedingungen auf.

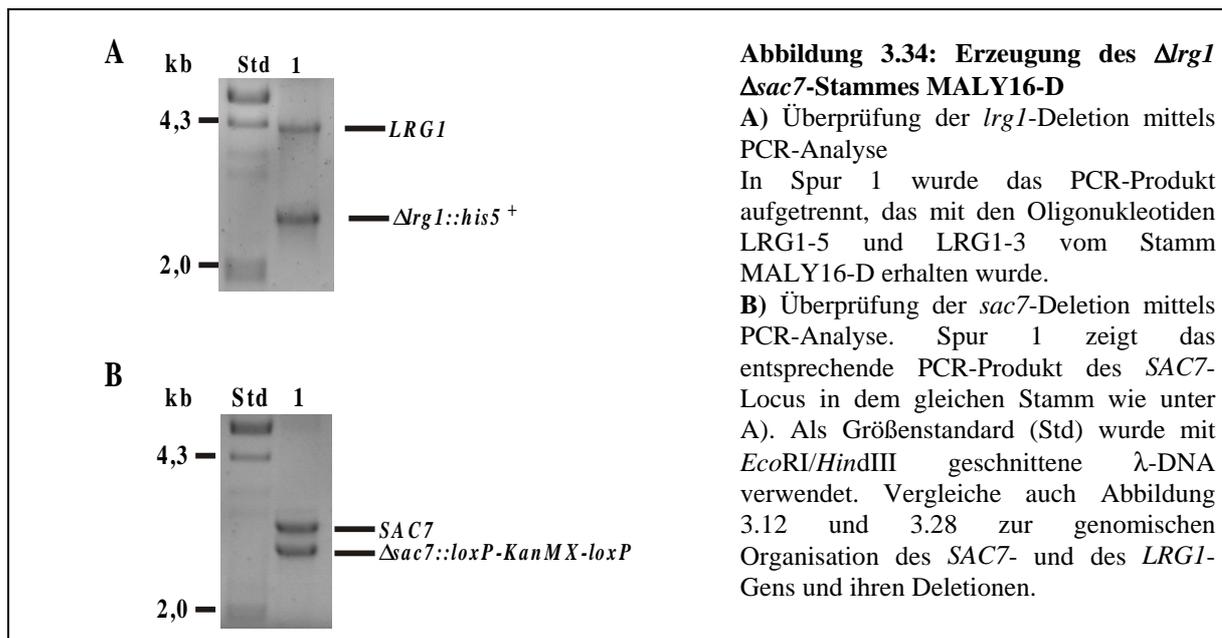


Dieses Ergebnis zeigt, daß die Deletion von *BAG7* sich nicht nur anders als die Deletion von *LRG1* oder *SAC7* in Kombination mit der *rom2*-Deletion verhält, sondern auch anders als die *bem2*-Deletion.

Abschließend läßt sich aus dieser Suppressionsanalyse vermuten, daß lediglich *SAC7* und *LRG1* für GTPase-aktivierende Proteine für Rho1p kodieren bzw. als Gegenspieler von Rom2p agieren. Durch die Deletion des für den GDP/GTP-Austauschfaktor kodierenden Gens *ROM2* verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Seite des Rho1-Proteins in der GDP-gebundenen Form. Durch die gleichzeitige Deletion des GTPase-aktivierenden Proteins sollte wieder eine höhere Konzentration an GTP-gebundenem Rho1p in der Zelle vorliegen. Somit erklärt sich, warum die Deletion des *SAC7*-Gens die Deletion von *Δrom2* komplementieren kann. Da für Sac7p seine GTPase-aktivierende Funktion für Rho1p bereits gezeigt wurde (Schmidt *et al.*, 1997) und sich Lrg1p hier identisch wie Sac7p verhält, liegt in diesen Ergebnissen ein weiterer Hinweis auf die Funktion von Lrg1p als weiteres GAP für Rho1p.

### 3.1.2.9 Gleichzeitige Deletionen von *LRG1* und *SAC7* zeigen einen synthetisch letalen Phänotyp

Da alle bisherigen Ergebnisse andeuten, daß es sich bei dem Lrg1-Protein wie bei dem Sac7-Protein, um ein auf Rho1p wirkendes GAP handelt, sollte der Phänotyp einer *lrg1 sac7*-Doppeldeletion analysiert werden. Dazu wurde das *SAC7*-Gen mit der *loxP-KanMX-loxP*-Kassette deletiert wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Der daraus resultierende diploide, für das *SAC7*-Gen heterozygote Stamm wurde mit MALY10-D bezeichnet. In MALY10-D wurde dann das *LRG1*-Gen mit dem *his5<sup>+</sup>*-Gen aus *S.pombe* deletiert (2.2.2.1). Es ergab sich der Stamm MALY16-D. Die PCR-Analyse, die bestätigt, daß beide Gene deletiert sind, ist in Abbildung 3.34 dargestellt.



MALY16-D wurde sporuliert und insgesamt wurden 60 Tetraden analysiert. Tabelle 3.5 gibt die Auswertung dieser Tetradenanalyse wieder.

Genotyp des diploiden Stammes MALY16 -D	Genotypen der möglichen Segreganten			
	<i>LRG1</i>	$\Delta lrg1::his5^+$	<i>LRG1</i>	$\Delta lrg1::his5^+$
<i>LRG1/Δlrg1::his5<sup>+</sup></i> <i>SAC7/Δsac7::loxP-KanMX-loxP</i>	<i>SAC7</i> (Wildtyp)	<i>SAC7</i>	<i>Δsac7::loxP-KanMX-loxP</i>	<i>Δsac7::loxP-KanMX-loxP</i>
Anzahl an lebensfähigen Segreganten	74	50	50	0

**Tabelle 3.5: Auswertung der Tetradenanalyse des diploiden Stammes MALY16-D (*LRG1/Δlrg1::his5<sup>+</sup>* *SAC7/Δsac7::KanMX*)**

Es wuchsen keine Segreganten, die sowohl das *his5<sup>+</sup>*-Gen von *S.pombe* als auch das Kanamycin-Resistenzgen tragen. Diese beiden Marken kennzeichnen die Deletionsallele von *LRG1* und *SAC7*. Damit ist die gleichzeitige Deletion von *LRG1* und *SAC7* synthetisch letal. Eine mikroskopische Analyse der nicht-lebensfähigen Sporen zeigte, daß diese sich noch etwa 4-5mal geteilt, aber dann das Wachstum eingestellt hatten. Damit liegt kein Defekt beim

Auskeimen der Sporen vor. Vielmehr verursacht der gleichzeitige Verlust der beiden Gene Defekte beim vegetativen Wachstum. Sind Lrg1p und Sac7p die einzigen auf Rho1p wirkenden GTPase-aktivierenden Proteine, so sollte dieses vorwiegend in der GTP-gebundenen Form vorliegen, was die synthetische Letalität erklären würde (siehe auch Diskussion). Auch damit deutet sich eine Wirkung von Lrg1p auf Rho1p an.

### 3.1.2.10 Funktionen von Lrg1p und Sac7p in der Zelle

Da alle bisherigen Daten auf eine ähnliche Funktion von Lrg1p und Sac7p hindeuten, sollte untersucht werden, ob weitere Gemeinsamkeiten in der Funktion beider Proteine bestehen.

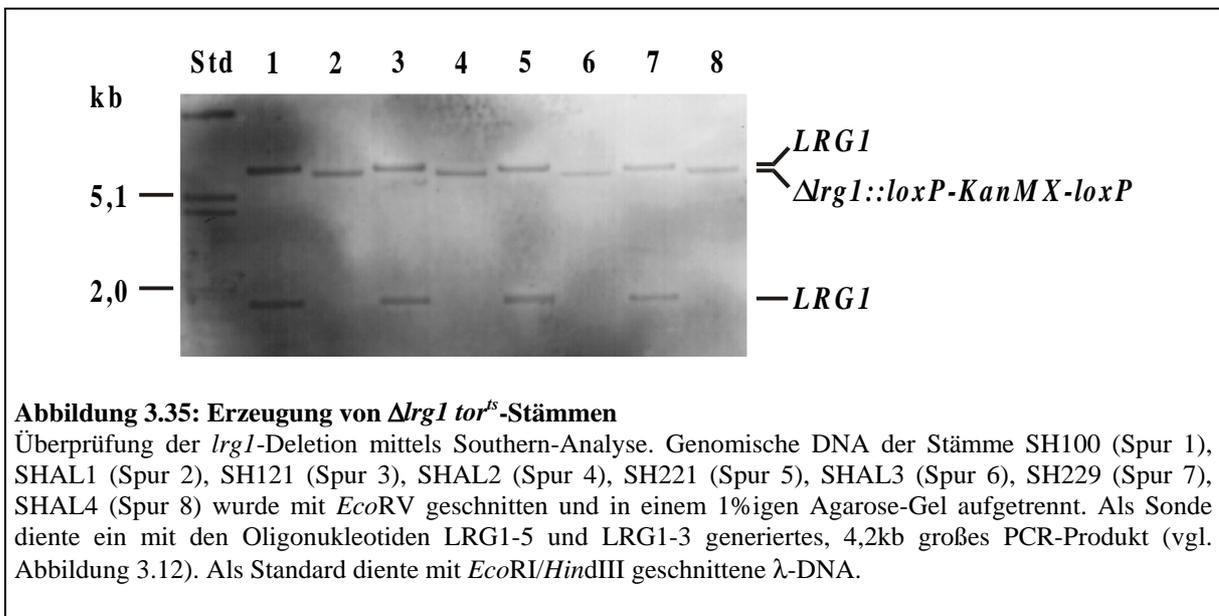
#### 3.1.2.10.1 Deletion von *LRG1* in verschiedenen *tor<sup>ts</sup>* - Mutanten

Schmidt *et al.* veröffentlichten 1997, daß die Deletion von *SAC7* die Temperatur-Sensitivität einer *tor*-Mutanten (SH121) aufhebt, die Defekte in der Tor2p-spezifischen Funktion zeigt. Um zu überprüfen, ob die Deletion von *LRG1* auch in dieser Funktion dem Sac7-Protein gleicht, wurde das *LRG1*-Gen in verschiedenen *tor*-Mutanten deletiert. Diese wurden freundlicherweise von Prof. M. Hall zur Verfügung gestellt (Helliwell *et al.*, 1998a). Wie unter 1.1.1.4 beschrieben, übernimmt das Tor2-Protein zwei trennbare Funktionen, die Tor2p-spezifische und die Tor1p- und Tor2p-gemeinsame Funktion. Entsprechend den Funktionen lassen sich *tor*-Mutanten verschiedenen Klassen zuordnen (Tabelle 3.6).

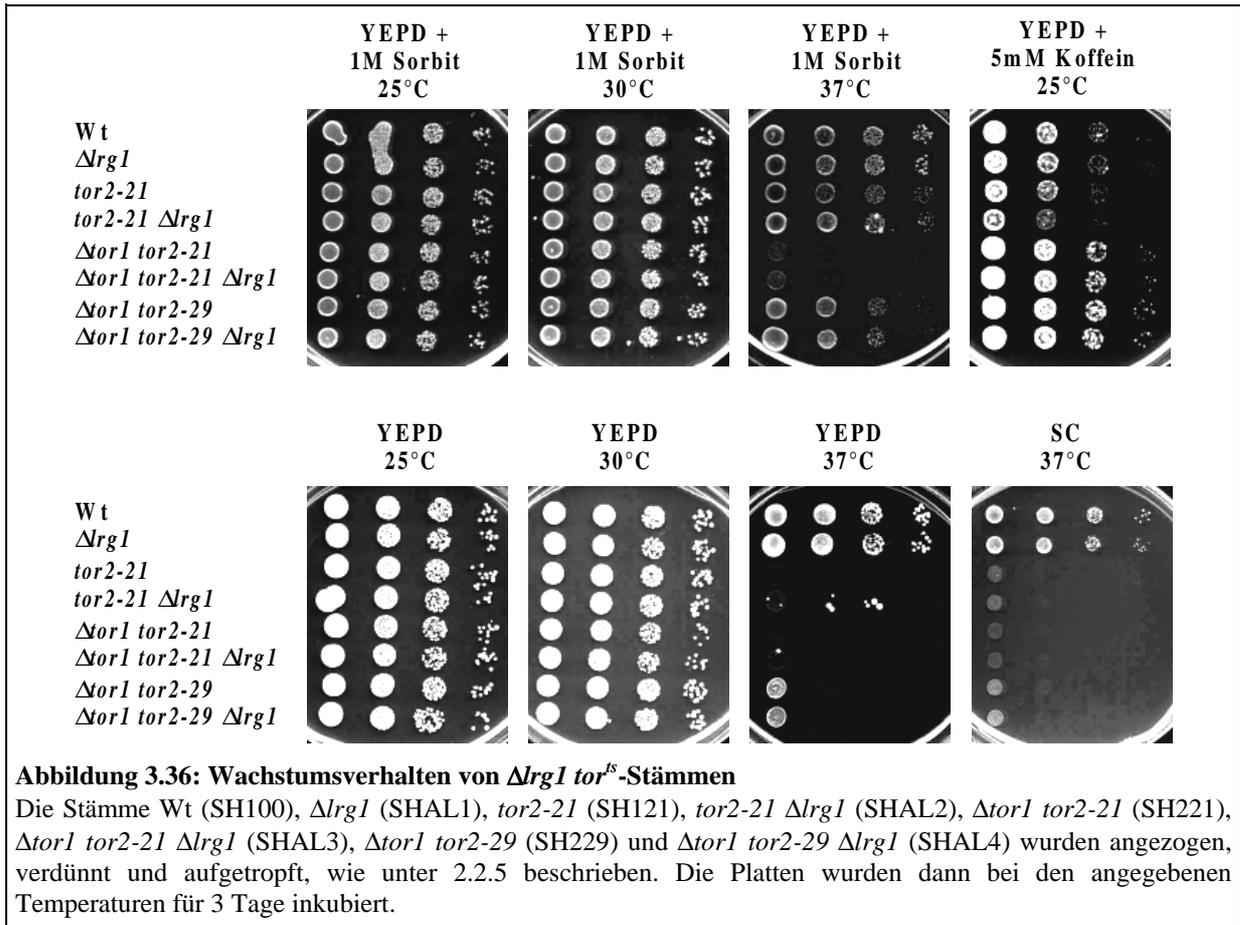
<i>tor</i> -Mutanten-Klasse	Defekt	Stamm	Relevanter Genotyp
keine	keiner	SH100	$\Delta tor2 + TOR2$
keine	keiner	SHAL1	$\Delta tor2 + TOR2$ $\Delta lrg1$
A	Tor2p-spezifische Funktion (Regulation des Aktinzytoskeletts)	SH121	$\Delta tor2 + tor2-21$
A	Tor2p-spezifische Funktion (Regulation des Aktinzytoskeletts)	SHAL2	$\Delta tor2 + tor2-21$ $\Delta lrg1$
B	Tor-gemeinsame Funktion (Kontrolle der Translations-Initiation und Fortschreiten in der G1-Phase)	SH229	$\Delta tor1 \Delta tor2$ $+ tor2-29$
B	Tor-gemeinsame Funktion (Kontrolle der Translations-Initiation und Fortschreiten in der G1-Phase)	SHAL4	$\Delta tor1 \Delta tor2$ $+ tor2-29$ $\Delta lrg1$
C	Tor2p-spezifische Funktion und Tor-gemeinsame Funktion	SH221	$\Delta tor1 \Delta tor2$ $+ tor2-21$
C	Tor2p-spezifische Funktion und Tor-gemeinsame Funktion	SHAL3	$\Delta tor1 \Delta tor2$ $+ tor2-21$ $\Delta lrg1$

**Tabelle 3.6:** Hier sind die verschiedenen Mutanten-Klassen der *tor<sup>ts</sup>*-Mutanten, als auch von diesen sich ableitende, in dieser Arbeit konstruierte Stämme aufgelistet. Ausführliche Genotypen siehe auch 2.1.2.1.1.

Zur Herstellung der *lrg1*-Deletion in den in Tabelle 3.6 beschriebenen Stämmen, wurde das *LRG1*-Gen, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, durch das *loxP-KanMX-loxP*-Deletionskonstrukt ersetzt. Die Transformanden wurden mit einer Southern-Analyse überprüft (Abbildung 3.35).

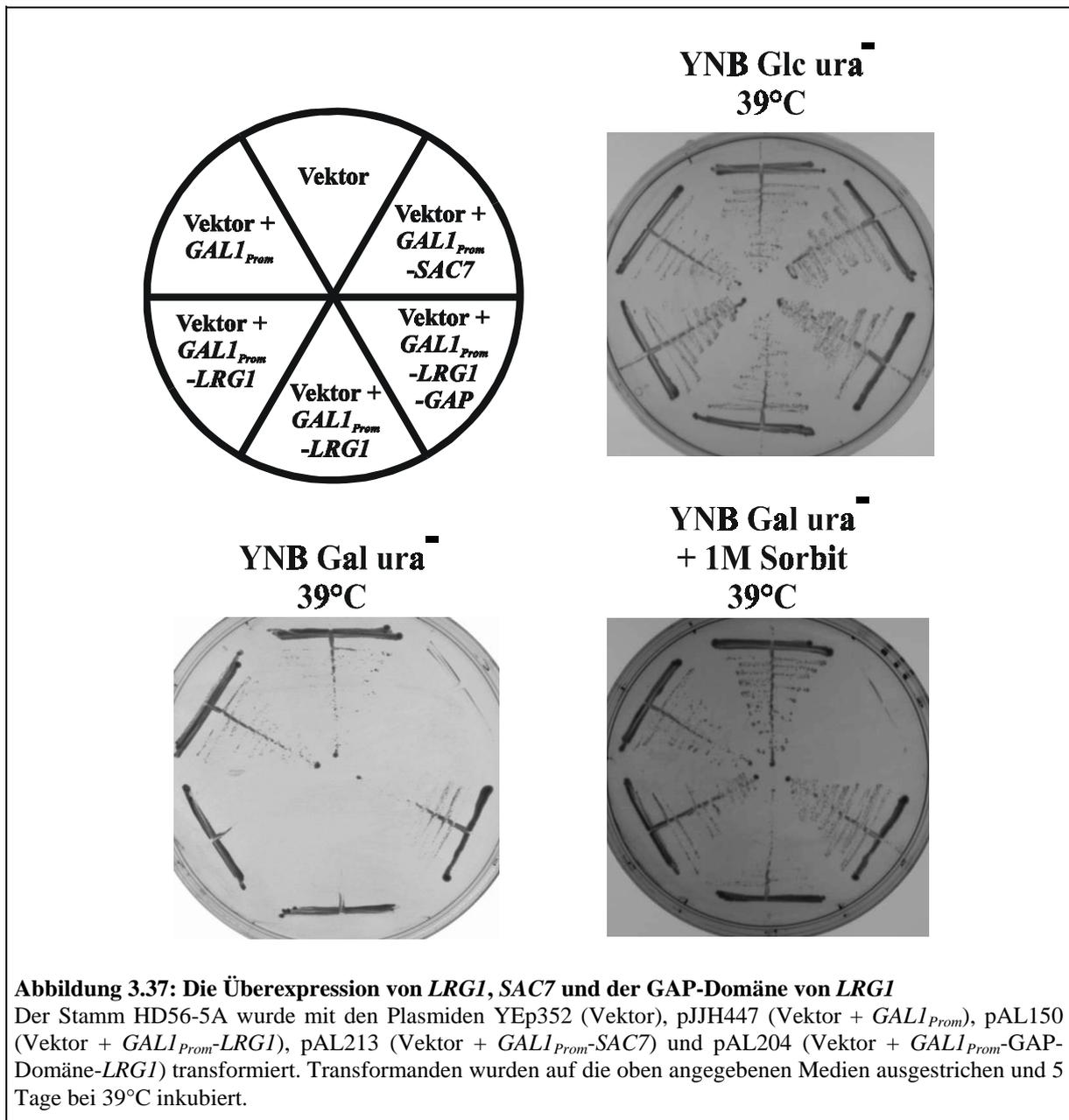


Bei der Southern-Analyse geben die Stämme SH100, SH121, SH221 und SH229 die *LRG1*-Wildtyp-Banden bei 6,8 und 1,8 kb. Durch Ersetzen des *LRG1*-Gens mit der *loxP-KanMX-loxP*-Kassette verkürzen sich die Banden auf 6kb und 0,8kb. Letztere ist auf der Southern-Analyse nicht mehr zu sehen. Die Überprüfung bestätigt die korrekten Deletionen in den *tor*-Mutanten. Um zu sehen, ob die *lrg1*-Deletion die Mutante mit dem Defekt in der Tor2p-spezifischen Funktion supprimieren kann, wurden Wachstumsanalysen durchgeführt (Abbildung 3.36). Die Suppressionswirkung im Stamm SH121 zeigt sich bei  $\Delta sac7$ -Stämmen besonders durch Wachstum auf Vollmedium (YEPD) bei 37°C (Schmidt *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu findet durch die Deletion von *LRG1* keine Suppression unter verschiedenen Wachstums-Bedingungen statt. Auch Mutanten, die defekt in der Tor-gemeinsamen oder in beiden Tor-Funktionen sind, können nicht durch die zusätzliche Deletion von *LRG1* supprimiert werden. Hierin besteht ein klarer Unterschied in der Funktion von Sac7p und Lrg1p.



### 3.1.2.10.2 Überexpression von *LRG1* und *SAC7*

Da nicht nur der Phänotyp einer Deletionsmutanten Aufschluß über die Funktion eines Gens geben kann, sondern häufig auch der Phänotyp der Überexpression dieses Gens, wurde nach Phänotypen der Überexpression des *LRG1*-Gens, der GAP-Domäne des *LRG1*-Gens und des *SAC7*-Gens gesucht. Zur Überexpression wurden die Plasmide pAL150, pAL204 und pAL213 (*LRG1*, *LRG1*-GAP-Domäne, *SAC7*) konstruiert (siehe Material und Methoden). Die Überexpression der Gene ist Galaktose-abhängig, da sie unter der Kontrolle des durch Galaktose induzierbaren *GALI*-Promotors (*GALI<sub>prom</sub>*) stehen. Nach Transformation dieser Plasmide in den Wildtyp-Stamm HD56-5A wurden Transformanten auf ihr Wachstum getestet (Abbildung 3.37).



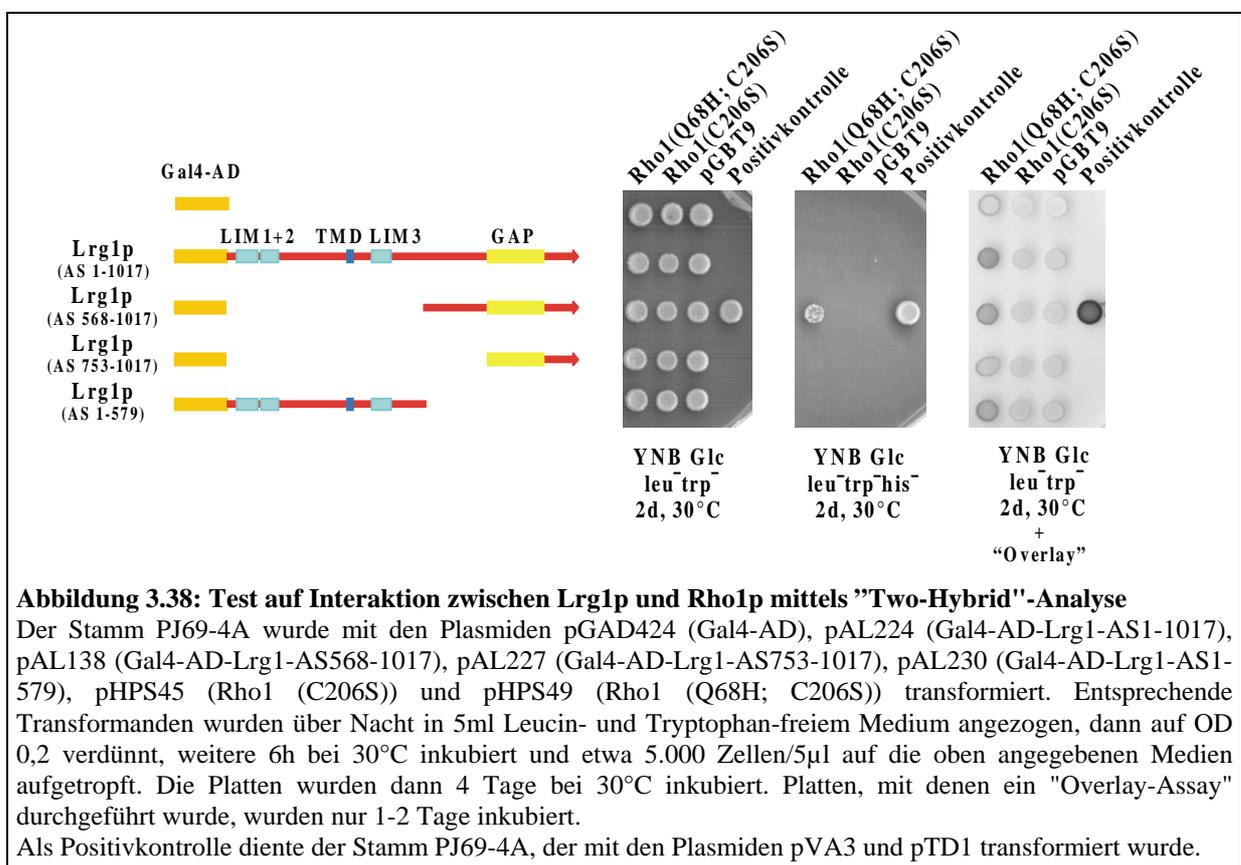
Unter reprimierenden Bedingungen bei Wachstum auf Glucose sind keine Wachstumsunterschiede zwischen Transformanden, die ausschließlich den Vektor oder den Vektor mit dem *GALI*-Promotor enthalten und Transformanden, die das *LRGI*-Gen, die GAP-Domäne von *LRGI* oder das *SAC7*-Gen überexprimieren, zu sehen. Unter induzierenden Bedingungen auf Galaktose führt die Überproduktion von *LRGI* zu einer Wachstumshemmung bei 39°C, die sich jedoch durch die Zugabe von Sorbit verhindern lässt. Auch die Überexpression von *SAC7* bei Wachstum auf Galaktose führt zu einer Wachstumshemmung, die jedoch nicht durch Zugabe osmotischer Stabilisatoren zu supprimieren ist. Dagegen führt die Überexpression nur der GAP-Domäne zu keinem sichtbaren Phänotyp.

Da der toxische Effekt einer *LRGI*-Überexpression durch Zugabe von 1M Sorbit supprimiert werden kann (Abbildung 3.40), sich der Effekt der *SAC7*-Überexpression so aber nicht verhindern lässt, findet sich hier der zweite Unterschied in der Funktionsweise von Lrg1p und Sac7p.

### 3.1.2.11 Test auf Wechselwirkung von Lrg1p mit kleinen GTPasen der Rho-Familie

#### 3.1.2.11.1 Test auf Interaktion von Lrg1p mit kleinen GTPasen der Rho-Familie über "Two-Hybrid"-Analyse

Die charakteristischen Strukturmerkmale des Lrg1-Proteins (Abbildung 3.14) und die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen deuteten an, daß Lrg1p möglicherweise als GAP auf ein kleines G-Protein oberhalb der Proteinkinase C wirken könnte. Da eine GAP-Domäne für Rho-Proteine abgeleitet wurde, sollte eine mögliche Wechselwirkung von Lrg1p mit Mitgliedern der Rho-Familie untersucht werden. In Hefe umfaßt diese Familie die Proteine Rho1p, Rho2p, Rho3p, Rho4p, Cdc42p und ein noch nicht näher charakterisiertes Rho5p (Garcia-Ranea und Valencia, 1998). Um Interaktionen zwischen Proteinen *in vivo* zu messen, wurde von Fields und Song (1989) eine Methode entwickelt, bei der die Stärke einer Transkriptionsaktivierung als Maß für die Stärke der Interaktion zweier Proteine gilt, das sogenannte "Two-Hybrid"-System. Dieses System ist besonders dazu geeignet, schwache oder vorübergehende Wechselwirkungen nachzuweisen (Guarente, 1993). Für den Test zwischen Rho1p und Lrg1p wurden an die Gal4p-DNA-Bindedomäne oder die Gal4p-Aktivierungsdomäne fusionierte Proteine exprimiert, die in dem Stamm PJ69-4A auf Interaktion getestet werden konnten, da dieser die Reporter-Gene *lacZ*, *HIS3* und *ADE3* unter Kontrolle von Gal4p-abhängigen Promotoren enthält. Als Wildtyp-Version des *RHO1*-Gens wurde das *RHO1*<sup>C206S</sup>-Allel verwendet. Dabei ist das Cystein an Position 206 zu einem Serin verändert, um eine Farnesylierung des Proteins zu verhindern und zu gewährleisten, daß das Rho1-Fusionsprotein in den Kern transloziert wird. Als hyperaktive Variante wurde ein Allel verwendet, das ein konserviertes Glutamin an Position 68 gegen ein Histidin ausgetauscht hat. Die Interaktion dieses mutierten Proteines mit dem GAP Sac7p wurde bereits gezeigt (Schmidt *et al.*, 1997). Das Ergebnis der "Two-Hybrid"-Analyse von Lrg1p mit Rho1p gibt Abbildung 3.38 wieder. Es wurde das Wachstum auf Histidin-freiem Medium betrachtet und die Stärke der  $\beta$ -Galaktosidase-Bildung als Maß für die Stärke der Interaktion.



Zellen, die mit Vektoren transformiert waren, die für die Fusionsproteine Gal4-Bd-Rho1(Q68H; C206S) und Gal4-AD-Lrg1 (AS 568-1017) kodieren, wuchsen auf Histidin-freiem Medium als ein Zeichen für eine Interaktion des C-terminalen Teils des Lrg1-Proteins mit dem hyperaktiven Rho1-Protein. Im Gegensatz dazu wurde zwischen dem Vollängen-Lrg1-Protein, einer C-terminalen Verkürzung des Lrg1-Proteins (AS 1-579) oder einer anderen N-terminalen Verkürzung des Lrg1-Proteins (AS 753-1017) mit dem hyperaktiven Rho1-Protein keine Interaktion beobachtet. Auch konnte keine Wechselwirkung zwischen dem Wildtyp-Rho1-Protein mit allen verwendeten Teilen des Lrg1-Proteins für das Wachstum auf Histidin-freiem Medium nachgewiesen werden.

Als nächstes wurde eine mögliche Interaktion zwischen Lrg1p und Rho5p untersucht. Auch hier wurde der "Two-Hybrid"-Stamm PJ694A verwendet, und in Analogie zu Rho1p auch mutierte Allele des *RHO5*-Gens. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefaßt.

Fusion an Gal4p-Binde-domäne	Fusion an Gal4p-Aktivierungsdomäne											
	T-Antigen		-		Lrg1 (AS 1-1017)		Lrg1 (AS 568-1017)		Lrg1 (AS 753-1017)		Lrg1 (AS 1-579)	
	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup>	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup>	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup>	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup>	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup>	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup>
-	n.d.	n.d.	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-
Rho5ΔC	n.d.	n.d.	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-
Rho5ΔC (Q65L)	n.d.	n.d.	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-
p53	blau	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 3.7: Zusammenfassung der "Two-Hybrid"-Analyse zur Interaktion zwischen der kleinen GTPase Rho5p und verschiedenen Teilbereichen des Lrg1-Proteins.**

Die Gal4<sub>pBD</sub>-Rho5ΔC-Fusion wird kodiert von dem Plasmid pHPS120, die Gal4<sub>pBD</sub>-Rho5ΔC(Q65L)-Fusion von pHPS119. Die Gal4<sub>pAD</sub>-Lrg1(1-1017)-Fusion wird kodiert von dem Plasmid pAL224, die Gal4<sub>pAD</sub>-Lrg1(568-1017)-Fusion von dem Plasmid pAL138, die Gal4<sub>pAD</sub>-Lrg1(753-1017)-Fusion von dem Plasmid pAL227 und die Gal4<sub>pAD</sub>-Lrg1(1-579)-Fusion von dem Plasmid pAL230. Als Vektorkontrolle wurden die Plasmide pGAD424 bzw. pGBT9 transformiert. Als Positivkontrolle dienten die Plasmide pTD1 (Gal4<sub>pAD</sub>-T-Antigen) und pVA3 (Gal4<sub>pBD</sub>-p53). Diese Plasmide wurden in den Stamm PJ69-4A transformiert und die Transformanden auf die Aktivitäten der Reporter-Gene getestet. Dabei gibt die Bezeichnung "*lacZ*" die Färbung der Kolonien nach einem "Overlay-Assay" an, der wie unter 2.2.16.3.1 beschrieben, durchgeführt wurde. "*HIS*" steht hierbei als Abkürzung für die Fähigkeit der Transformanden auf Histidin-freiem Medium zu wachsen.

Das Rho5-Protein zeigte weder auf Histidin-freiem Medium noch mit *lacZ* als Reporter-Gen eine Wechselwirkung mit Lrg1p.

Schließlich wurde noch die Wechselwirkung zwischen Lrg1p und Rho2p, Rho3p, Rho4p und Cdc42p getestet. Die für die Rho-Fusionsproteine kodierenden Plasmide wurden freundlicherweise von Yoshimi Takai zur Verfügung gestellt. Für diese "Two-Hybrid"-Analyse wurde diesmal der Stamm DL40 verwendet, da die Mitglieder der Rho-Familie an die *lexA*-Bindedomäne fusioniert sind und ein Stamm benötigt wird, der Bindestellen für *LexA* in den Promotoren der Reporter-Gene besitzt. Das Ergebnis dieser "Two-Hybrid"-Analyse ist in Tabelle 3.8 zusammengefaßt.

Fusion an lexA- Binde- domäne	Fusion an VP16- Aktivierungs- domäne KlGal80		Fusion an Gal4p-Aktivierungsdomäne									
			-		Lrg1 (AS 1-1017)		Lrg1 (AS 568-1017)		Lrg1 (AS 753- 1017)		Lrg1 (AS 1-579)	
	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup> 7mM 3-AT	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup> 7mM 3-AT	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup> 7mM 3-AT	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup> 7mM 3-AT	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup> 7mM 3-AT	<i>lacZ</i>	<i>HIS</i> <sup>-</sup> 7mM 3-AT
-	n.d.	n.d.	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-
Rho2ΔC	n.d.	n.d.	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-
Rho2ΔC (Q65L)	n.d.	n.d.	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+
Rho3ΔC	n.d.	n.d.	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-
Rho3ΔC (Q74L)	n.d.	n.d.	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+
Rho4ΔC	n.d.	n.d.	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-	weiß	-
Rho4ΔC (Q70L)	n.d.	n.d.	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+
Rho4ΔC (T24N)	n.d.	n.d.	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+
Cdc42ΔC	n.d.	n.d.	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+	hell blau	+
Cdc42ΔC (G12V)	n.d.	n.d.	blau	++	blau	++	blau	++	blau	++	blau	++
KlGal1	hell blau	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**Tabelle 3.8: Zusammenfassung der "Two-Hybrid"-Analyse zur Interaktion zwischen den kleinen GTPasen Rho2p, Rho3p, Rho4p und Cdc42p und verschiedenen Teilbereichen des Lrg1-Proteins.**

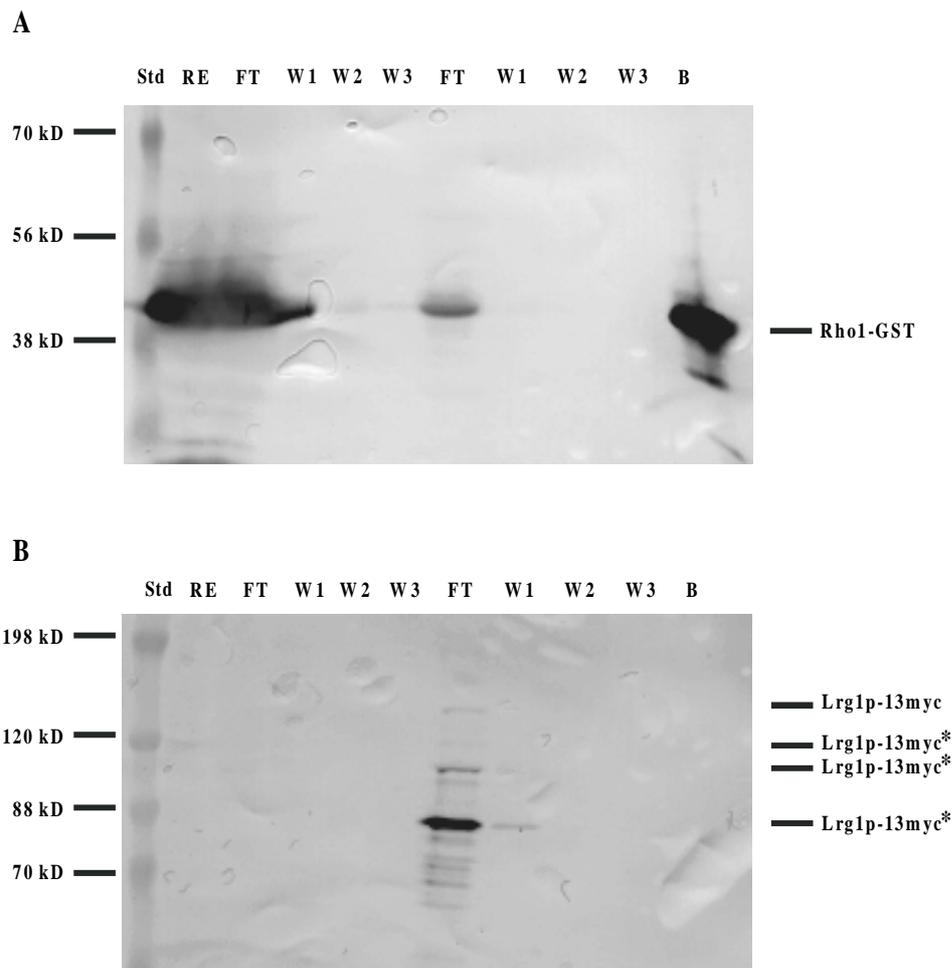
Zur "Two-Hybrid"-Analyse wurden alle Plasmide in den Stamm DL40 transformiert und die Transformanten auf die Aktivitäten der Reporter-Gene getestet. Dabei gibt die Bezeichnung "*lacZ*" die Färbung der Kolonien nach einem "Overlay-Assay" an, der wie unter 2.2.16.3.1 beschrieben, durchgeführt wurde. "*HIS*<sup>-</sup>" + 7mM 3-AT steht hierbei als Abkürzung für die Fähigkeit der Transformanten auf Histiden-freiem Medium zu wachsen, das zusätzlich noch 7mM 3-Aminotriazol enthielt. Die Fusion von *lexA*-Rho2ΔC wird kodiert von dem Plasmid pBTM116-HA-RHO2ΔC, die *lexA*-Rho2ΔC(Q65L)-Fusion von pBTM116-HA-RHO2ΔC(Q65L), die *lexA*-Rho3ΔC-Fusion von pBTM116-HA-RHO3ΔC, die *lexA*-Rho3ΔC(Q74L)-Fusion von pBTM116-HA-RHO3ΔC(Q74L), die *lexA*-Rho4ΔC-Fusion von pBTM116-HA-RHO4ΔC, die *lexA*-Rho4ΔC(Q70L)-Fusion von pBTM116-HA-RHO4ΔC(Q70L), die *lexA*-Rho4ΔC(T24N)-Fusion von pBTM116-HA-RHO4ΔC(T24N), die *lexA*-Cdc42ΔC-Fusion von pBTM116-HA-CDC42ΔC und die *lexA*-Cdc42ΔC(G12V)-Fusion von pBTM116-HA-CDC42ΔC (G12V). Die Gal4p<sub>AD</sub>-Lrg1(1-1017)-Fusion wird kodiert von dem Plasmid pAL224, die Gal4p<sub>AD</sub>-Lrg1(568-1017)-Fusion von dem Plasmid pAL138, die Gal4p<sub>AD</sub>-Lrg1(753-1017)-Fusion von dem Plasmid pAL227 und die Gal4p<sub>AD</sub>-Lrg1(1-579)-Fusion von dem Plasmid pAL230. Als Vektorkontrolle wurden die Plasmide pGAD424 bzw. pBTM116 transformiert. Als Positivkontrollen wurden die Plasmide pVKG80-WT und plexAG1-WT verwendet, die für ein VP16-Gal80-Fusionsprotein bzw. für ein *lexA*-Gal1-Fusionsprotein kodieren.

Bei diesem Test zeigte sich bei keinem der Rho-Fusionsproteine eine Interaktion mit den verschiedenen Teilen des Lrg1-Proteins. Ein großes Problem bei diesem Test war, daß die verwendeten Plasmide, insbesondere die Plasmide, die für die Fusionsproteine hyperaktiver Varianten der Rho-Proteine kodierten, eine hohe Hintergrundaktivität mit dem leeren Vektor aufweisen. Da sich aber keine der getesteten Lrg1p-Varianten gegen diese hohe Hintergrundaktivität absetzte, wurde dies als fehlende Interaktion zwischen Lrg1p und Rho2p, Rho3p, Rho4p oder Cdc42p gewertet.

#### 3.1.2.11.2 Test auf Interaktion von Lrg1p mit Rho1p über gemeinsame Aufreinigung

Eine andere Möglichkeit zum Nachweis einer Interaktion zwischen zwei Proteinen ist eine gemeinsame Aufreinigung ("Co-Purification") nach einer *in vitro*-Bindung der zu testenden Proteine. Hierzu wurde der Stamm HD56-5A mit dem Plasmid pHPS106 bzw. mit dem Plasmid pAL183 transformiert. Das Plasmid pHPS106 kodiert für ein Rho1-GST-Fusionsprotein, das Plasmid pAL183 für ein Lrg1-13myc-Fusionsprotein, dessen kodierendes Gen unter Kontrolle des *GALI*-Promotors steht. Die beiden Transformanden wurden angezogen und Rohextrakte hergestellt (siehe 2.2.16.4.1). Als erstes wurde das Rho1-GST-Fusionsprotein an die Säule gebunden. Nach Zugabe des zweiten Rohextraktes sollte dem Lrg1-13myc-Fusionsprotein erlaubt sein, an das schon gebundene Rho1-GST-Fusionsprotein zu binden. Die Bindung erfolgte in Anwesenheit von nicht-hydrolysiertem GTP, um einen möglichen Komplex zwischen Lrg1 und Rho1p zu stabilisieren, da GTPase-aktivierende Proteine die GTP-gebundene Form der GTPase binden. Alle Rohextrakte und Waschfraktionen wurden mit Hilfe einer Western-Analyse analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.39 gezeigt.

Es zeigte sich, daß das Rho1-GST-Fusionsprotein erfolgreich an die Säule gebunden werden konnte, nachgewiesen mit einem Antikörper, der gegen GST gerichtet ist (Abbildung 3.39 A). Der Antikörper detektierte ein Protein von etwa 45kD im Vergleich zu einer berechneten Masse von 50kD für das Rho1-GST-Fusionsprotein. Im Gegensatz dazu konnte mit Antikörpern, die gegen das c-myc-markierte Lrg1-Protein gerichtet sind lediglich in der Durchlaufraction und der ersten Waschfraction noch eine Bindung mehrerer Proteine festgestellt werden. Das Lrg1-13myc-Fusionsprotein hat eine berechnete Masse von 137kD. In dieser Größe ist schwach ein Protein nachzuweisen. Neben dieser schwachen Bande finden sich weitere starke Banden bei etwa 100kd und bei 80kd. Es scheint, daß es zu einem starken Abbau des Proteins kommt. Obwohl in der Elutionsfraction kein Vollängen-Lrg1-13myc-Fusionsprotein nachzuweisen ist, kann hieraus nicht gefolgert werden, daß keine Interaktion zwischen Rho1p und Lrg1p stattfindet, da das Lrg1-Protein in Hefe exprimiert offensichtlich sehr instabil ist. Dies zeigte sich auch schon in anderen Western-Analysen (Daten nicht gezeigt). Neben der gemeinsamen Aufreinigung von Lrg1p und Rho1p wurde auch noch versucht, aus einem Stamm, der sowohl das Lrg1-13myc- als auch das Rho1-GST-Fusionsprotein exprimiert, beide Proteine gleichzeitig zu präzipitieren (siehe 2.2.16.5). Auch mit dieser Methode konnte die Interaktion zwischen Lrg1p und Rho1p nicht direkt nachgewiesen werden, was auch hier möglicherweise auf die geringe Menge des Vollängen-Lrg1-13myc-Fusionsproteins zurückzuführen ist. Möglicherweise lag damit die Konzentration des Rho1-GST-Fusionsproteins unter der Nachweisgrenze dieser Methode.



**Abbildung 3.39: Aufreinigung von Rho1p und Lrg1p mittels Glutathionsepharose**

Die Proben wurden behandelt wie unter 2.2.16.4 beschrieben. Es wurde aufgetragen: Rohextrakt (RE), Durchfluß 1 (FT1), Waschfraktion 1 (W1), Waschfraktion 2 (W2), Waschfraktion 3 (W3), Durchfluß2 (FT2), Waschfraktion 1 (W1), Waschfraktion 2 (W2), Waschfraktion 3 (W3), gebundenes Protein (B)

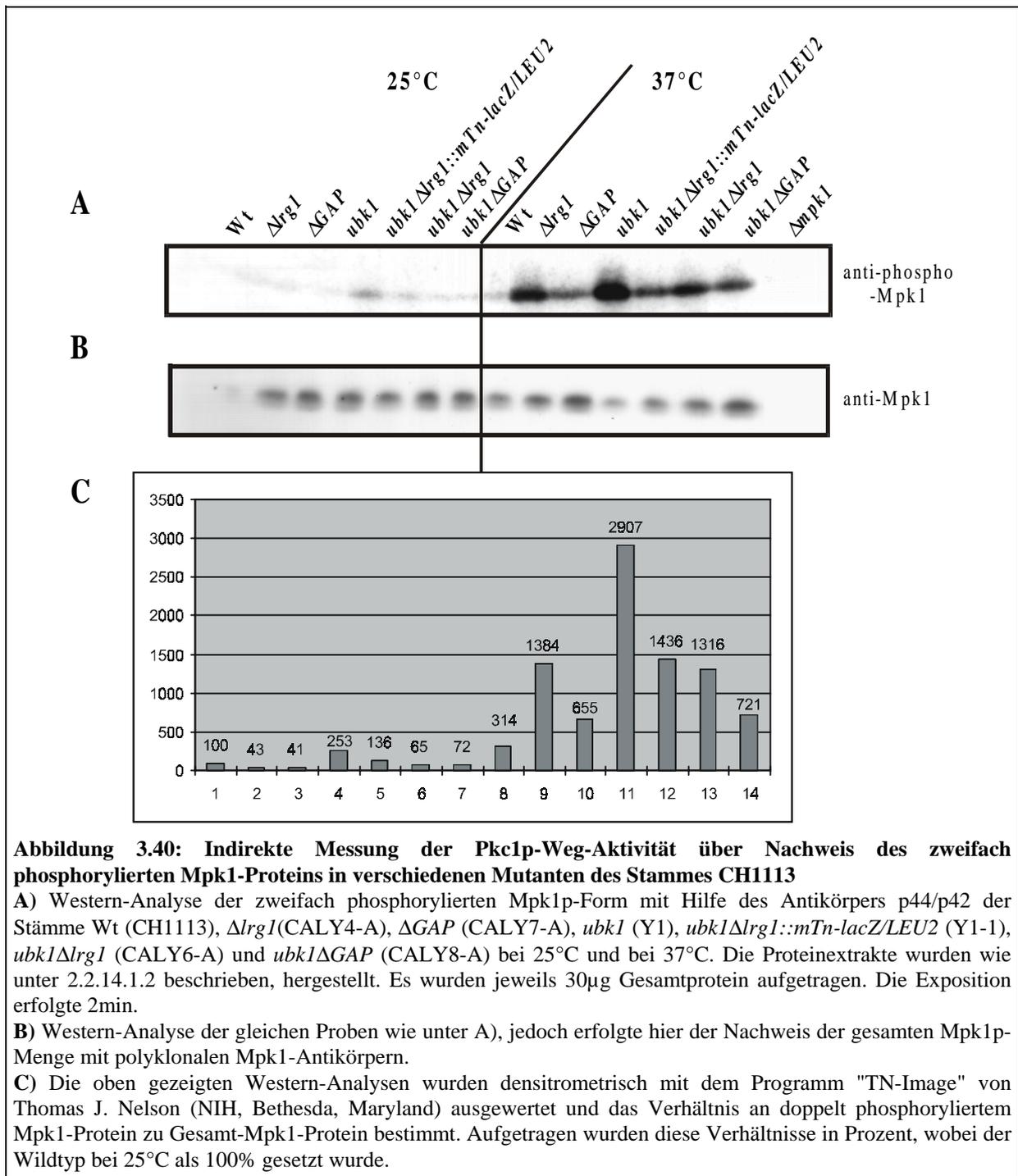
A) Nachweis der Proteine mit GST-Antikörper. Der Nachweis erfolgte wie unter 2.2.16.6.7 beschrieben.

B) Nachweis der Proteine wie unter A), jedoch mit myc-Antikörper. Der Nachweis erfolgte wie unter 2.2.16.6.8.

### 3.1.2.12 Messung der Pkc1p-Weg Aktivität in verschiedenen Mutanten

#### 3.1.2.12.1 Immunologischer Nachweis von Mpk1p in CH1113-Derivaten

Martín *et al.* (2000) zeigten, daß der Nachweis von zweifach phosphorylierter MAP-Kinase Mpk1p mittels eines gegen p44/p42 gerichteten Antikörpers als Maß für die Aktivierung des Weges sehr gut geeignet ist. Da alle oben beschriebenen Ergebnisse auf eine Beteiligung von Lrg1p am Pkc1p-vermittelten Signaltransduktionsweg als negativen Regulator für Rho1p deuten, sollte mittels dieser Methode untersucht werden, ob in *lrg1*-Deletionen auch eine Erhöhung der Basalaktivität des Weges zu finden ist. Außerdem sollte untersucht werden, wie stark der Weg in der ursprünglichen *ubk1*-Mutante und in *ubk1 Δlrg1*-Mutanten induziert ist. Abbildung 3.40 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.



Bei 25°C, also unter nicht-induzierenden Bedingungen zeigen sich nur geringe Unterschiede in den verschiedenen Stämmen. Es ist jedoch sichtbar, daß bei 25°C in der  $ubk1$ -Mutanten und dem Stamm Y1-1 das Verhältnis von phosphorylierter Form zu Gesamt-Mpk1p-Menge im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist (Abbildung 3.40C). Bei 37°C ist eine Erhöhung sogar bei allen Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die Deletion von *LRG1* führt hier zu einem 4,4-fachen Anstieg dieses Verhältnisses im Vergleich zum Wildtyp. Die Deletion der GAP-Domäne hingegen führt nur zu einer 2,1-fachen Erhöhung. Dies könnte auf einen negativen Effekt der verbleibenden N-terminalen Domäne des Lrg1-Proteins hindeuten, der sich auch schon bei der Phänotyp-Analyse andeutete (Abbildung 3.16). Überraschenderweise zeigt auch die  $ubk1$ -Mutante (*rom2*-Mutante) einen fast 9,3fachen Anstieg im Verhältnis von aktiviertem Mpk1-Protein zu Gesamt-Mpk1-Protein. Dies ist

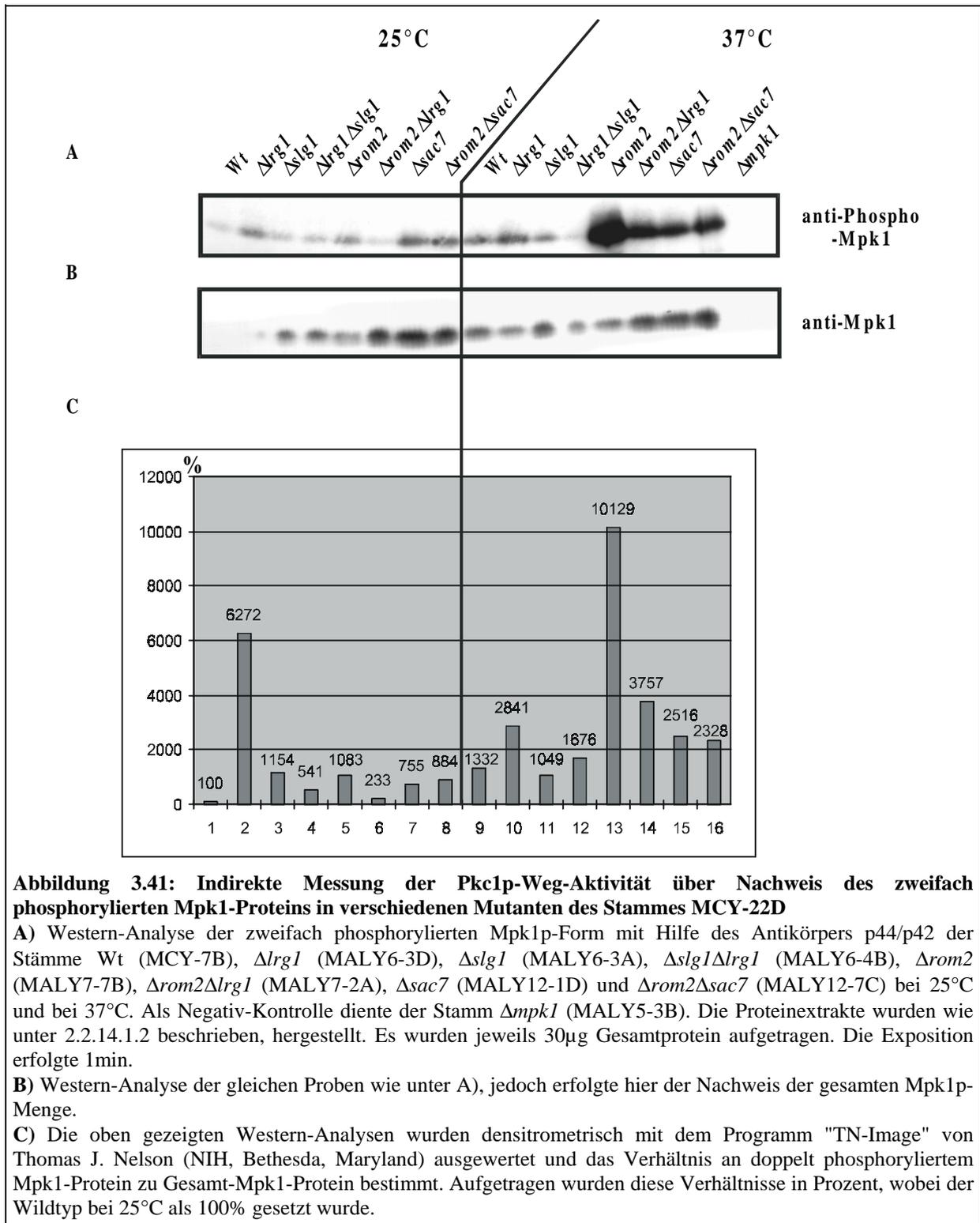
besonders erstaunlich, da für Rom2p eine positive Regulationsfunktion in der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion als GDP/GTP-Austauschfaktor postuliert wurde (Ozaki *et al.*, 1996). Die zusätzliche Deletion von *LRG1* oder seiner GAP-Domäne reduzieren diesen sehr hohen Level an phosphoryliertem Mpk1-Protein wieder. Damit sind die phänotypischen Defekte der *ubk1*-Mutanten nicht auf eine verminderte Menge an phosphoryliertem Mpk1-Protein zurückzuführen. Außerdem zeigt sich, daß Lrg1p nicht nur als negativer Regulator wirken kann, was durch die erhöhte Aktivität des Weges in der Lrg1-Deletion ersichtlich wird. Es scheint, als agiere Lrg1p auch als positiver Regulator, da seine Deletion in Mutanten mit erhöhter Mpk1-Aktivität diese wieder erniedrigt.

#### 3.1.2.12.2 Immunologischer Nachweis von Mpk1p in MCY-22D-Derivaten

Da unter 3.1.1.9 gezeigt wurde, daß die Ausprägung der Phänotypen von *rom2*-Mutanten in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm variieren kann, sollte zum einen getestet werden, ob die *rom2*-Mutante im MCY-22D-Stammhintergrund ein anderes Phosphorylierungsverhältnis zeigt als die *rom2*-Mutante im CH1113-Hintergrund. Außerdem sollte untersucht werden, welchen Einfluß eine zusätzliche Deletion von *LRG1* auf das Phosphorylierungsverhältnis in einer  $\Delta$ *slg1*-Mutanten hat bzw. die *SAC7*-Deletion auf eine  $\Delta$ *rom2*-Mutante. Daher wurden verschiedene Mutantenstämme, wie unter 2.2.16.1.2 beschrieben, angezogen und präpariert. Die entsprechenden Extrakte wurden einer Western-Analyse unterzogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.41 dargestellt.

Es zeigte sich, daß in Mutanten im MCY-22D-Stammhintergrund nicht nur die Menge des phosphorylierten Mpk1-Proteins verändert ist, sondern auch die Gesamtmenge an Mpk1-Protein bei gleichen aufgetragenen Proteinnengen stärker variiert als bei Mutanten des Stammes CH1113. Eine Auswertung bei der die doppelt-phosphorylierte Menge im Verhältnis zum Gesamt-Mpk1-Protein gesetzt wurde, gibt dabei das Ausmaß der Aktivierung des Weges wieder. Es zeigt sich, daß in *lrg1*-Deletionsstämmen bei 25°C eine über 60fache Erhöhung von phosphoryliertem Mpk1-Protein zu Gesamt-Mpk1-Protein zu finden ist, als auch eine zweifache Erhöhung bei 37°C. Dagegen findet sich in *slg1*-Deletionsstämmen eine 1,3fache Verminderung bei 37°C. Die gleichzeitige Deletion von *LRG1* führt zum Wiederherstellen der Hitze-induzierten Phosphorylierung von Mpk1p. Ferner zeigt sich in *rom2*-Deletionen, wie in der *ubk1*-Mutanten, ein erhöhtes Verhältnis von phosphoryliertem Mpk1-Protein zu Gesamt-Protein sowohl um den Faktor 10 bei 25°C und um den Faktor 8 bei 37°C. Durch die zusätzliche Deletion sowohl von *LRG1* als auch von *SAC7* kann dieses extrem erhöhte Niveau um das 2,7fache bzw. um das 4,4fache im Vergleich zur  $\Delta$ *rom2*-Mutanten bei 37°C erniedrigt werden.

Diese Daten deuten an, daß Lrg1p und Sac7p nicht nur als negative Regulatoren des Weges agieren, sondern in Kombination mit der *rom2*-Deletion dafür nötig sind, ein bestimmtes Maß an Aktivierung zu gewährleisten.

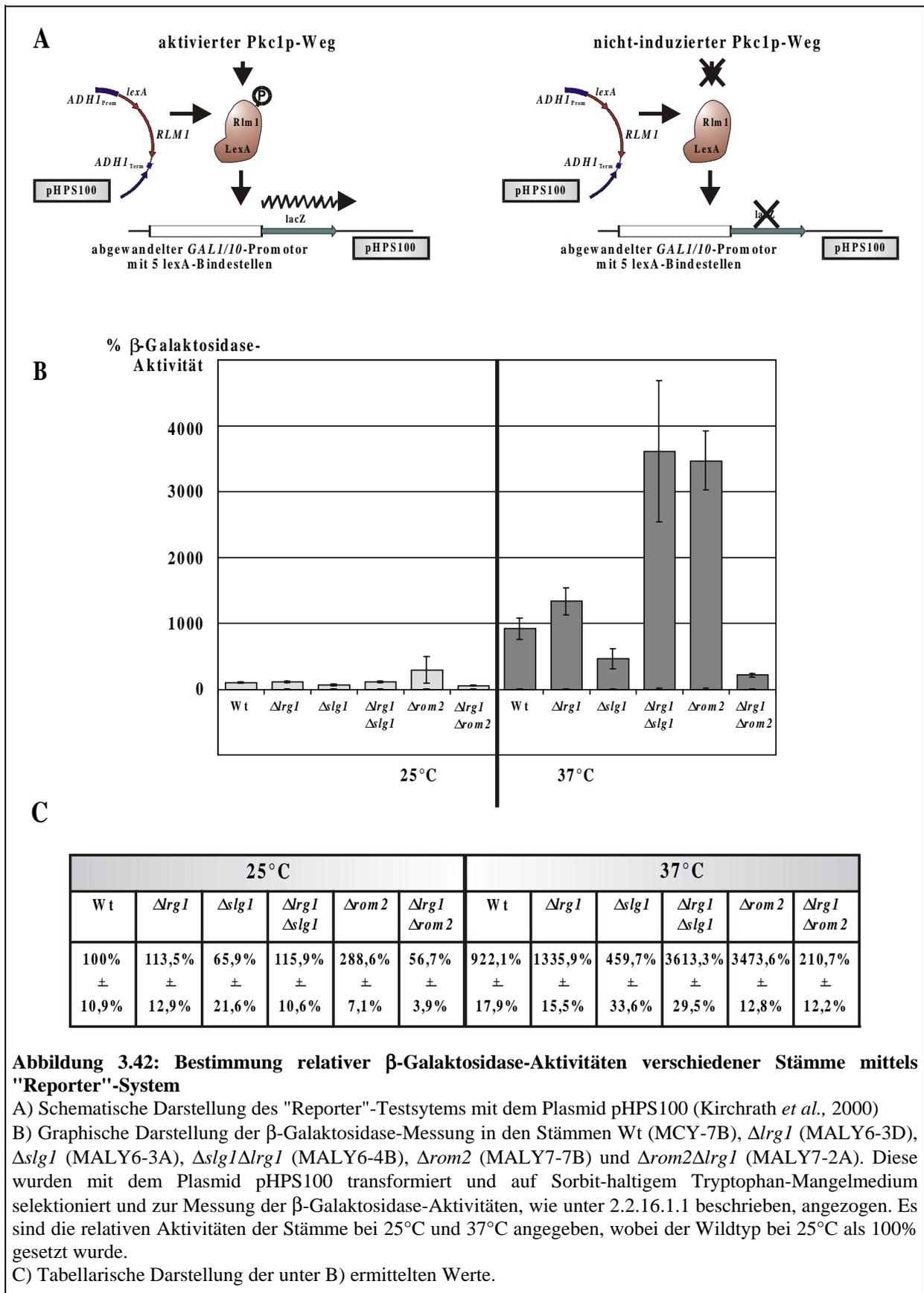


### 3.1.2.12.3 Messung der Pkc1p-Weg-Aktivität mittels einem *lacZ*-Reporter-System

Diese Methode wurde in Analogie zu einem von Watanabe *et al.* (1997) entwickelten System durchgeführt (Abbildung 3.42A; Kirchrath *et al.*, 2000). Es handelt sich dabei um einen indirekten Nachweis der transkriptionellen Aktivierung eines *lacZ*-Reporter-Gens, das selbst durch das Fusionsprotein *lexA-ΔN-Rlm1p* reguliert wird. Dabei wird von dem Reporter-Plasmid pHPS100 ein *lexA-ΔN-Rlm1p*-Fusionsprotein kodiert. Außerdem enthält das Plasmid das Reporter-Gen *lacZ*, das unter Kontrolle eines modifizierten *GALI*-Promotors steht, der 5 *lexA*-Bindestellen inseriert hat. Watanabe *et al.* (1997) konnten zeigen, daß das *lexA-ΔN-Rlm1p*-Fusionsprotein Mpk1p-abhängig phosphoryliert wird und auch nur bei Anwesenheit von Mpk1p die Transkription aktivieren kann. Daher wurde Rlm1p als direktes Zielprotein von Mpk1p postuliert (Dodou und Treisman, 1997; Watanabe *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997). Für den indirekten Nachweis der Pkc1p-Weg-Aktivität wurde daher das Plasmid pHPS100 in verschiedene Stämme transformiert, die Transformanden wurden angezogen wie unter 2.2.16.1.1 beschrieben und die Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt (Abbildung 3.42).

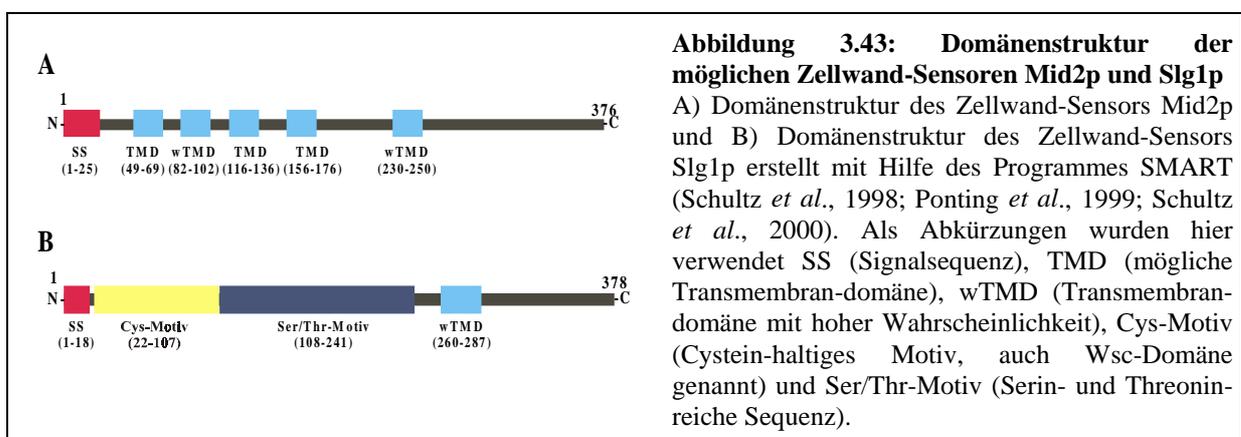
Es zeigte sich, wie schon bei der Bestimmung des phosphorylierten Mpk1-Proteins, daß die  $\Delta$ *lrg1*-Mutante bei 25°C eine minimale, bei 37°C eine knapp 1,2fache Erhöhung der  $\beta$ -Galaktosidase bewirkt. Die  $\Delta$ *slg1*-Mutante dagegen zeigte eine etwa zweifach verringerte Induktion des Weges bei 37°C. Durch die gleichzeitige Deletion von *LRG1* wurde die verringerte Aktivität in der *slg1*-Mutanten wieder aufgehoben und sogar noch um ein 3,5faches erhöht. Die  $\Delta$ *rom2*-Mutante zeigte wie im Mpk1-Phosphorylierungsnachweis auch eine erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, bei 25°C um etwa das dreifache, bei 37°C um das 3,5fache. Durch die gleichzeitige Deletion von *LRG1* konnte diese hohe Aktivierung auf ein niedrigeres Maß zurückgeführt werden: bei 25°C auf etwa die Hälfte der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und bei 37°C um das dreifache im Vergleich zum Wildtyp.

Dieser Reporter-Test steht in Einklang mit den Ergebnissen, die beim Nachweis der zweifach phosphorylierten Form des Mpk1-Proteins in den Mutanten-Stämmen unter 3.1.2.12.2 erhalten wurden.



### 3.1.2.13 Untersuchung der Wechselwirkung von Lrg1p mit dem zytoplasmatischen Teil der möglichen Sensoren Slg1p und Mid2p

Die Proteine Slg1p, aber auch Mid2p, wurden als Zellwand-Sensoren des Pkc1p-Weges in der Zytoplasmamembran beschrieben (Verna *et al.*, 1997, Ketela *et al.*, 1999). Es ist bisher jedoch nicht bekannt, über welchen Mechanismus sie den Pkc1p-Weg aktivieren. Dies könnte zum einen über eine direkte Aktivierung des Weges, beispielsweise über die Aktivierung von Rom2p erfolgen. Eine andere Möglichkeit wäre, daß dieses Protein negative Regulatoren durch Bindung inaktiv hält. Da die Deletion von *LRG1* auch die Phänotypen einer  $\Delta$ *slg1*-Mutanten supprimieren kann (3.1.2.5.2), könnte man sich vorstellen, daß Slg1p das Lrg1-Protein inaktiv hält. Beim Ausfall von Slg1p würde Lrg1p konstitutiv den Pkc1p-Weg deaktivieren. Bei gleichzeitigem Ausfall beider Proteine würde sich dann wiederum kein Effekt zeigen. Slg1p und Mid2p zeigen eine charakteristische Domänenstruktur (Abbildung 3.43).



**Abbildung 3.43: Domänenstruktur der möglichen Zellwand-Sensoren Mid2p und Slg1p**

A) Domänenstruktur des Zellwand-Sensors Mid2p und B) Domänenstruktur des Zellwand-Sensors Slg1p erstellt mit Hilfe des Programmes SMART (Schultz *et al.*, 1998; Ponting *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000). Als Abkürzungen wurden hier verwendet SS (Signalsequenz), TMD (mögliche Transmembran-domäne), wTMD (Transmembran-domäne mit hoher Wahrscheinlichkeit), Cys-Motiv (Cystein-haltiges Motiv, auch Wsc-Domäne genannt) und Ser/Thr-Motiv (Serin- und Threoninreiche Sequenz).

Da die Deletion von *LRG1* die Phänotypen einer *slg1*-Deletion supprimiert (vgl. 3.1.2.7.2) sollte im Folgenden untersucht werden, ob Lrg1p mit den genannten Sensoren wechselwirkt. Dies wurde mittels "Two-Hybrid"-Analyse getestet. Es wurden Plasmide (pAL229, pAL228) konstruiert, die Fusionsproteine der Gal4p-Bindedomäne und den zytoplasmatischen Teilen der Proteine Mid2p und Slg1p exprimieren.

Es war keine Interaktion zwischen den zytoplasmatischen Teilen des Slg1- bzw. des Mid2-Proteins und verschiedenen Teilen des Lrg1-Proteins nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

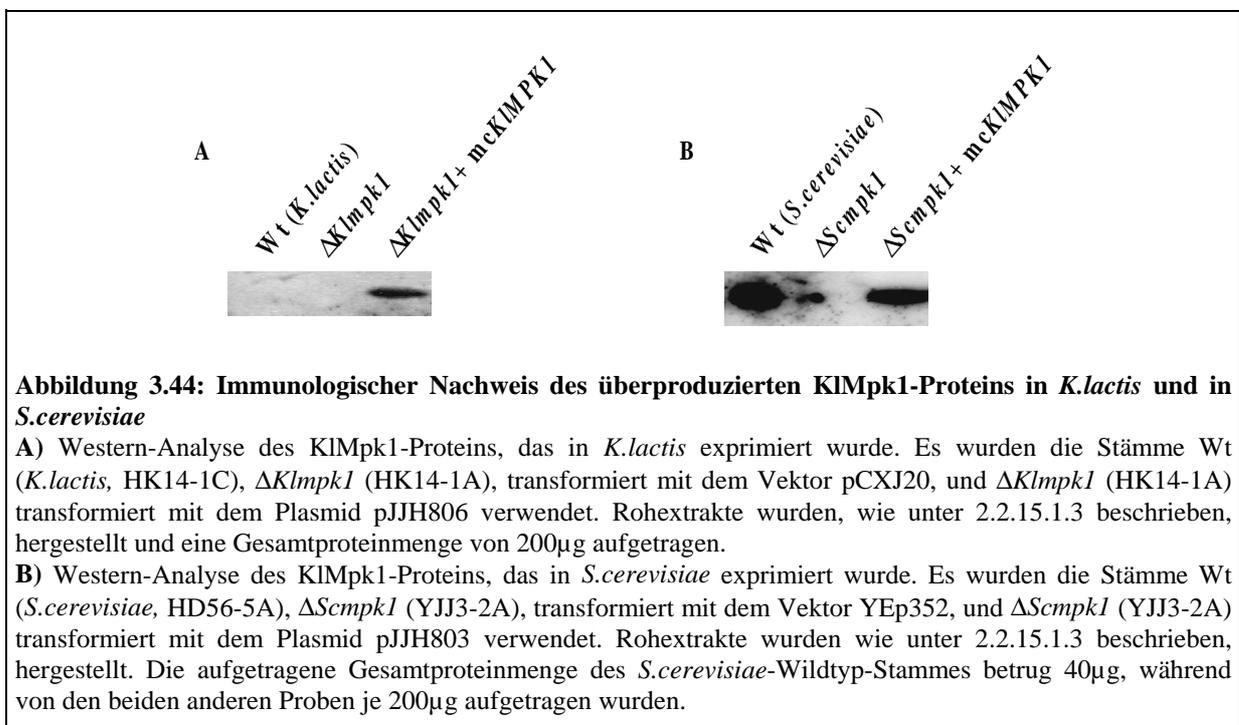
### 3.2 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktionsweg in *Kluyveromyces lactis*

Forschungen an homologen Organismen trugen häufig zum näheren Verständnis biologischer Abläufe bei. So haben beispielsweise Untersuchungen an *K.lactis*, insbesondere bei der Regulation des Galaktose-Metabolismus wesentlich zur Aufklärung der Regulationsmechanismen auch in *S.cerevisiae* beigetragen (Zenke *et al.*, 1996).

Aus diesem Grunde und der Tatsache, daß über den Proteinkinase C-Weg in der Milchhefe noch nichts bekannt war, wurde in unserem Labor mit Untersuchungen zur Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion in *K.lactis* begonnen. Bisher konnte das für die MAP-Kinase-Kinase kodierende Gen *KIBCK1* über heterologe Hybridisierung isoliert werden (Jacoby *et al.*, 1999). Ebenso wurde das für die MAP-Kinase kodierende Gen *KIMPK1* über Komplementation einer *S.cerevisiae*  $\Delta mpk1$ -Mutanten isoliert (Kirchrath *et al.*, 2000).

#### 3.2.1 Expression von KIMpk1p in *K.lactis* und *S.cerevisiae*

Die Überexpression von *ScMPK1* bewirkt in *S.cerevisiae* ein vermindertes Wachstum (Mizunuma *et al.*, 1998). Die Überexpression von *KIMPK1* in der  $\Delta Scmpk1$ -Mutante oder im *S.cerevisiae*-Wildtypstamm, ebenso in einer  $\Delta Klmpk1$ -Mutante oder im *K.lactis*-Wildtypstamm führte jedoch zu keinem sichtbaren Effekt (J.Heinisch, persönliche Mitteilung). Um sicherzustellen, daß die Überexpression von *KIMPK1* in *S.cerevisiae* als auch in *K.lactis* wirklich zu keinem sichtbaren Phänotyp führt, mußte erst überprüft werden, ob das Protein tatsächlich verstärkt produziert wird. Aus diesem Grunde wurde eine Western-Analyse durchgeführt (Abbildung 3.44).



**Abbildung 3.44: Immunologischer Nachweis des überproduzierten KIMpk1-Proteins in *K.lactis* und in *S.cerevisiae***

**A)** Western-Analyse des KIMpk1-Proteins, das in *K.lactis* exprimiert wurde. Es wurden die Stämme Wt (*K.lactis*, HK14-1C),  $\Delta Klmpk1$  (HK14-1A), transformiert mit dem Vektor pCXJ20, und  $\Delta Klmpk1$  (HK14-1A) transformiert mit dem Plasmid pJH806 verwendet. Rohextrakte wurden, wie unter 2.2.15.1.3 beschrieben, hergestellt und eine Gesamtproteinmenge von 200 $\mu$ g aufgetragen.

**B)** Western-Analyse des KIMpk1-Proteins, das in *S.cerevisiae* exprimiert wurde. Es wurden die Stämme Wt (*S.cerevisiae*, HD56-5A),  $\Delta Scmpk1$  (YJJ3-2A), transformiert mit dem Vektor YEp352, und  $\Delta Scmpk1$  (YJJ3-2A) transformiert mit dem Plasmid pJH803 verwendet. Rohextrakte wurden wie unter 2.2.15.1.3 beschrieben, hergestellt. Die aufgetragene Gesamtproteinmenge des *S.cerevisiae*-Wildtyp-Stammes betrug 40 $\mu$ g, während von den beiden anderen Proben je 200 $\mu$ g aufgetragen wurden.

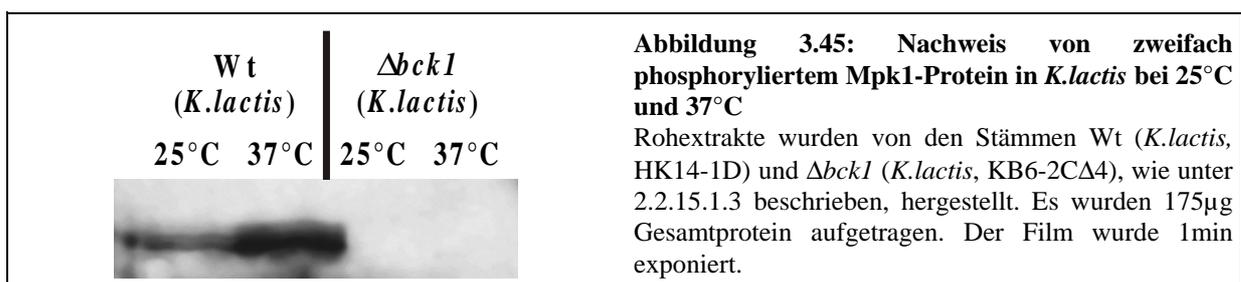
Mit Hilfe des gegen das ScMpk1-Protein gerichteten Antikörpers konnte ein Protein mit einer Masse von etwa 60kD sowohl in dem *S.cerevisiae*-Überproduzenten als auch in dem *K.lactis*-Überproduzenten (Abbildung 3.44) detektiert werden. Diese Größe stimmt gut mit der abgeleiteten Masse von 59,7kD überein. Desweiteren zeigte sich, daß bei einer aufgetragenen Menge von 200 $\mu$ g Gesamtprotein das chromosomal kodierte KIMpk1-Protein mit dem

heterologen Antikörper nicht nachzuweisen war (Abbildung 3.44A). Dies könnte auf eine schlechte Kreuzreaktion des *S.cerevisiae*-spezifischen-anti-Mpk1-Antikörpers mit dem *K.lactis*-Mpk1-Protein zurückzuführen sein. Diese Vermutung bestätigt sich weiter, wenn man die Western-Analyse der *S.cerevisiae*-Stämme betrachtet (Abbildung 3.44B). Der *S.cerevisiae*-Wildtypstamm ergab bei nur 40µg aufgetragenem Gesamtprotein von chromosomal kodiertem ScMpk1-Protein ein stärkeres Signal, als der  $\Delta Scmpk1$ -Stamm, der das KIMpk1-Protein überproduzierte und die 4fache Menge an Gesamtprotein geladen hatte. Trotz der schlechten Nachweisbarkeit des KIMpk1-Proteins mit den *S.cerevisiae*-spezifischen Antikörpern zeigt dieses Experiment eindeutig, daß das Protein sowohl in *S.cerevisiae* als auch in *K.lactis* erfolgreich überproduziert wurde.

### 3.2.2 Phosphorylierung von KIMpk1p in $\Delta Klbck1$ -Mutanten

Die ersten Studien zu Pkc1p-Weg-Mutanten in *K.lactis* zeigten überraschenderweise, daß die erzeugten  $\Delta Klbck1$ -Mutanten im Gegensatz zu *S.cerevisiae*  $\Delta bck1$ -Mutanten keine Sensitivität gegen erhöhte Temperatur, Koffein, Staurosporin, Calcofluor White, Nystatin, Fluphenazin, Amphotericin B oder Fluconazol aufwiesen (Jacoby *et al.*, 1999). Lediglich eine leichte Sensitivität der Deletionsmutanten gegenüber SDS nach längerer Inkubation war zu beobachten. Diese Beobachtung wäre erklärbar durch die Existenz eines weiteren Proteins, das die Funktion von Bck1p ersetzen könnte. Ein dafür kodierendes Gen konnte aber in nicht-stringenten Hybridisierungen nicht nachgewiesen werden (Jacoby *et al.*, 1999). Nachfolgende Untersuchungen zeigten weiter, daß andere Pkc1p-Weg-Mutanten in *K.lactis* mit Pkc1p-Weg-Mutanten in *S.cerevisiae* vergleichbare Phänotypen aufwiesen. So zeigten  $\Delta Klmpr1$ -Mutanten in Analogie zu *S.cerevisiae*-Mutanten einen deutlichen Phänotyp, wie z.B. eine Temperatur-Sensitivität auf Voll- und Minimalmedium und eine Sensitivität gegen Calcofluor White, Koffein und SDS (Kirchrath *et al.*, 2000).

Es stellte sich daher die Frage, woher der Unterschied der Phänotypen von  $\Delta Klbck1$ -Mutanten zu *Klmpr1*-Deletionsmutanten rührt. Näheren Aufschluß sollte die Analyse des Phosphorylierungsstatus des Mpk1-Proteins in  $\Delta Klbck1$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp geben wird. Dazu sollte das für *S.cerevisiae* verwendete System zum Nachweis von doppelt-phosphoryliertem Mpk1p-Protein auch für *K.lactis* etabliert werden. Die Western-Analyse zum Nachweis von phosphorylierten KIMpk1-Protein ist in Abbildung 3.45 gezeigt.



Es zeigte sich zum einen, daß der p44/p42-Antikörper, der gegen ein synthetisches Phospho-Threonin/Tyrosin-Peptid der menschlichen MAP-Kinase p44 gerichtet ist, auch mit der doppelt phosphorylierten Form des KIMpk1-Proteins kreuzreagiert. Außerdem wird eine Phosphorylierung auch in *K.lactis* Temperatur-abhängig induziert, da eine höhere Menge an phosphoryliertem Mpk1-Protein bei 37° als bei 25°C nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt die  $\Delta Klbck1$ -Mutante weder eine Phosphorylierung des Mpk1-Proteins bei 25°C noch bei 37°C. Da wie unter 3.2.1 beschrieben die Gesamtmenge an Mpk1-Protein in *K.lactis* aufgrund der schlechten Kreuzreaktion des *S.cerevisiae*-spezifischen Antikörpers nicht nachgewiesen werden konnte, wurden als Maß für gleiche Proteinmengen die beiden Untereinheiten der Phosphofruktokinase mit *S.cerevisiae*-spezifischen Pfk-Antikörpern, die

auch mit dem *K.lactis* Pfk1- und Pfk2-Protein kreuzreagieren (Heinisch *et al.*, 1993), nachgewiesen (J. Heinisch, persönliche Mitteilung).

Damit ist gezeigt, daß in  $\Delta Klbck1$ -Mutanten das Mpk1-Protein nicht mehr in nachweisbaren Mengen phosphoryliert werden kann.

## 4. Diskussion

### 4.1 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktions-Weg in der Hefe *S.cerevisiae*

Der Proteinkinase C-Weg ist einer von 7 MAP-Kinase-Wegen der Bäckerhefe (Herskowitz, 1995; Banuett, 1998; Gustin *et al.*, 1998; Cullen *et al.*, 2000). Als solcher ist er wichtig für die Erhaltung der Zellintegrität, die Zellwandsynthese und die Regulation des Aktinzytoskeletts. Außerdem ist der Weg an der Wahrnehmung des Nährstoffangebots beteiligt. Entsprechend reagiert der Pkc1p-Weg auf eine ganze Reihe verschiedener Signale, wie Zellwandschäden, Hitzeschock, Osmoschock oder Paarungspheromon (Abbildung 1.2; Heinisch *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist bisher für die Aktivierung der anderen MAP-Kinase-Wege jeweils nur ein Signal bekannt (Abbildung 1.3).

Als mögliche Plasmamembran-lokalisierte Sensoren des Pkc1p-Weges wurden Slg1p, Wsc2p, Wsc3p, Mid2p und Mtl1p beschrieben, deren genauer Aktivierungsmechanismus allerdings noch nicht aufgeklärt ist (Gray *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998; Ketela *et al.*, 1999).

Wie bei allen Regulationsprozessen stellt sich außerdem auch beim Pkc1p-Weg das Problem der gezielten Deaktivierung. Hierzu liegen nur sehr vereinzelte Erkenntnisse vor. Einige negativ-regulierende Faktoren, wie die beiden GTPase-aktivierenden Proteine Sac7p und Bem2p oder die Phosphatasen Msg5p, Ptp2p und Ptp3p sind bereits als solche identifiziert worden (Peterson *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1995; Mattison *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2000).

Trotz aller Bemühungen die molekularen Mechanismen der Aktivierung und Deaktivierung des Pkc1p-Weges aufzuklären, sind diese noch ebenso unverstanden, wie die Natur der Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Signaltransduktionswegen. Die vorliegende Arbeit sollte in diesem Zusammenhang zur weiteren Aufklärung beitragen.

#### 4.1.1 Identifizierung von *UBK1* als *ROM2*

Der erste Teil dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung eines bisher unbekanntes Gens, dessen Produkt oberhalb der Pkc1p wirken sollte und in einer früheren Arbeit vorläufig als *UBK1* bezeichnet wurde (Jacoby, 1997). Die entsprechende *ubk1*-Mutante wurde dabei durch einen genetischen Ansatz identifiziert. Es zeigte sich, daß die *ubk1*-Mutante nur nach osmotischer Stabilisierung des Mediums bei Temperaturen von 14°C-37°C wachsen konnte. Die Anwesenheit eines hyperaktiven *BCK1-20*-Allels hob dieses Bedürfnis für osmotische Stabilisatoren auf. Auch zeigte die Mutante eine Koffein-Sensitivität, die sich nicht durch das *BCK1-20*-Allel aufheben ließ. Da diese Charakteristika auf einen Defekt im Pkc1p-Weg hindeuteten, sollte das *UBK1*-Gen hier identifiziert und näher beschrieben werden.

Für die Identifizierung des Gens wurden in dieser Arbeit verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurde der Vermutung nachgegangen, daß das gesuchte Gen auf Chromosom XV liegen sollte (J.Heinisch, persönliche Mitteilung). Untersuchungen mit heterozygot diploiden Stämmen, die jeweils gezielt ein bestimmtes Chromosom verlieren können, hatten zu dieser Vermutung geführt. Die hier durchgeführte Kopplungsanalyse mit integrierten Marker-Genen konnte eine Lokalisation von *UBK1* auf diesem Chromosom allerdings nicht bestätigen (Tabelle 3.2). Vielmehr zeigten erneute Experimente, daß das Auftreten der gesuchten Phänotypen nach einem Verlust des Chromosoms XV eher auf dem schlechten Wachstum des entsprechenden aneuploiden Stammes beruht und damit auf ein Artefakt zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).

Ein zweiter Versuch zur Identifizierung des *UBK1*-Gens wurde auf der Basis eines Kolonie-Sektorierungs-Ansatzes in Verbindung mit einer Transposon-Mutagenese durchgeführt

(Abbildung 3.3). Die damit isolierten Stämme hatten nach der Mutagenese das Transposon meist ins endogene  $2\mu$ -Plasmid integriert, so daß ein gehäuftes Auftreten "Falsch-Positiver" beobachtet wurde. Warum gerade die Integration in das endogene  $2\mu$ -Plasmid den gewünschten Phänotyp ergab, ist nicht klar. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde auf eine Ausweitung des "Screening"-Verfahrens verzichtet.

Ergebnisse dieser und anderer parallel laufender Versuche legten zu diesem Zeitpunkt die Vermutung nahe, daß es sich bei *UBK1* um ein *ROM2*-Allel handeln könnte. Obwohl dies bisher vorliegenden Daten zu widersprechen schien (Jacoby, 1997), wurde in einem dritten Ansatz diese Möglichkeit direkt untersucht. Dabei konnte sowohl durch Komplementations-, als auch durch Kreuzungsanalysen (Abschnitte 3.1.1.6 und 3.1.1.7) gezeigt werden, daß das *UBK1*-Gen tatsächlich allel zu dem *ROM2*-Gen ist. Dieses ist auf dem Chromosom XII lokalisiert, was die fehlende Kopplung mit den auf Chromosom XV integrierten Marker-Genen erklärt (Abbildung 3.2 und Tabelle 3.2).

Befunde aus einer Reihe von Veröffentlichungen legten bereits eine Funktion des Rom2-Proteins in der Pkc1p-vermittelten Signalübertragung nahe. Das *ROM2*-Gen wurde ursprünglich als Homologes des *ROM1*-Gens beschrieben, das als Hochkopienzahl-Suppressor einer Temperatur-sensitiven, dominant-negativen *rho1*-Mutanten (*rho1*-G22S/D125N) isoliert wurde (Ozaki *et al.*, 1996). Die Autoren konnten zeigen, daß Rom2p einen GDP/GTP-Austauschfaktor für die GTPase Rho1p darstellt, die durch Bindung die Proteinkinase C und damit die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). Später konnte auch bei der Suche nach Mutanten, die eine erhöhte Sensitivität gegen "Calcofluor White" zeigten, eine *rom2*-Mutante identifiziert werden (Lussier *et al.*, 1997). "Calcofluor White" ist ein negativ-geladener Fluoreszenzfarbstoff, der an wachsende Ketten von Chitin bindet und durch Verhinderung einer Kokristallisation die Bildung von Mikrofibrillen verhindert und damit die Zellwand schwächt (Elorza *et al.*, 1983). Somit zeigen *rom2*-Mutanten Zellwand-Defekte. Dies unterstreicht die Funktion von Rom2p in der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion. Auch die Tatsache, daß die *ubk1*-Mutante mit einem Defekt im *ROM2*-Gen auf einen daueraktiven Pkc1p-Weg angewiesen ist (Wachstum ohne osmotische Stabilisatoren nur mit dem hyperaktiven *BCK1-20*-Allel), bestätigt eine solche Funktion.

Die Identifizierung des *UBK1*-Gens als *ROM2* im Verlaufe dieser Arbeit stimmt mit der Beobachtung von Jacoby (1997) überein, daß auch *ROM1* die *ubk1*-Mutante in hoher Kopienzahl supprimiert. Eine Suppression von *rom2*-Mutanten durch Überexpression seines Homologen *ROM1* wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt (Ozaki *et al.*, 1996).

Die Sequenzierung des *ROM2*-Gens aus der *ubk1*-Mutanten lieferte den endgültigen Beweis für die Identität beider Gene. Sie zeigte eine Rasterschub-Mutation an Nukleotid-Position 3322 des offenen Leserasters. Die Mutation liegt in einer Folge von Adenin-Resten. Es finden sich anstelle von 6 nur noch 5 Adenine. Die identifizierte Mutation ist leicht erklärbar, wenn man die Art der Mutantengewinnung in Betracht zieht. Die *ubk1*-Mutante wurde durch UV-Mutagenese gewonnen (Jacoby, 1997). Die im komplementären Strang aufeinanderfolgenden Thymidin-Nukleotide werden auch als sogenannte "Hot Spots" bei der UV-Mutagenese bezeichnet und bilden Thymidin-Dimere (Brash und Haseltine, 1982). Werden diese nicht durch Reparaturmechanismen entfernt, so manifestiert sich in der nächsten Replikationsrunde die Mutation.

Die Rasterschub-Mutation innerhalb des *ROM2*-Gens führt im vorliegenden Fall zu einer Verkürzung des Wildtyp-Proteins von 1356 auf 1116 Aminosäuren im mutanten Protein. Diese Veränderung tritt in der sogenannten **PH**-Domäne (**P**leckstrin **h**omology) auf. Solche Domänen sind weit verbreitet in Proteinen, die an der Signaltransduktion oder an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind (Musacchio *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1994; Blomberg *et al.*, 1999). Sie werden häufig als regulierte Membran-bindende Domänen bezeichnet, die Phosphatidylinositolphosphate oder Inositolphosphate binden und damit eine Lokalisierung an die Plasmamembran oder an intrazelluläre Organellen-Membranen bewirken

(Blomberg *et al.*, 1999). Auch eine Bindung an  $\beta\gamma$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine wurde beschrieben (Touhara *et al.*, 1994). In manchen Fällen konnte sogar gezeigt werden, daß die PH-Domäne direkt die enzymatische Aktivität einer angrenzenden Domäne, z.B. einer Kinase- oder einer GDP/GTP-Austauschfunktion, allosterisch regulieren kann (Salim *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 1996). In anderen Untersuchungen zeigte sich, daß die PH-Domäne eine Assoziation mit Streß-induzierten Aktin-Fibrillen bewirkt (Olson *et al.*, 1997). So kommen der PH-Domäne eine Vielzahl von Funktionen zu.

Tatsächlich scheint der PH-Domäne im Rom2-Protein eine essentielle Rolle zuzukommen. So zeigen sowohl Stämme mit der ursprünglichen Verkürzung in der *ubk1*-Mutanten als auch die zur Kontrolle nochmals durch *in vitro*-Mutagenese erzeugten Stämme mit fehlender PH-Domäne Phänotypen, die der kompletten *rom2*-Deletion entsprechen. Auch in anderen Arbeiten konnte die Bedeutung der PH-Domäne bestätigt werden. So wird sie für die Suppressionswirkung von Rom2p in einer *tor2-21*-Mutanten benötigt (Schmidt *et al.*, 1997). Welche der oben genannten möglichen Funktionen diese Domäne in Rom2p genau ausübt, kann aus den vorliegenden Daten allerdings nicht geschlossen werden.

Für die Funktion als GEF *in vitro* ist im Gegensatz zu diesen Untersuchungen die PH-Domäne von Rom2p allerdings entbehrlich. Ozaki *et al.* (1996) verwendeten nur einen Teil des Rom2-Proteins (von Aminosäure 623-917), dem sowohl die DEP- als auch die PH-Domäne fehlen (siehe Abbildung 3.17). Durch ein solches Protein wird die Dissoziation von GDP von Lipid-modifiziertem Rho1-Protein bzw. die Bindung von GTP an Lipid-modifiziertes Rho1p *in vitro* gefördert. Dabei wurde eine um das zehnfache verringerte Aktivität bei der Verwendung von nicht mit Lipid modifiziertem Rho1p gefunden.

Angesichts dieser Daten könnte man zur Funktion von Rom2p in der *ubk1*-Mutanten folgendes spekulieren: Durch den Verlust der PH-Domäne könnte das Protein zwar seiner enzymatischen Funktion noch nachkommen, wäre aber intrazellulär falsch lokalisiert. Es käme damit nicht mehr in die räumliche Nähe seines potentiellen Interaktionspartners, um seine enzymatische Funktion korrekt auszuführen. Ein direkter regulatorischer Einfluß auf die GDP/GTP-Austauschaktivität wäre ebenfalls denkbar, ist aber eher unwahrscheinlich, da die Vollängen- als auch die PH-Domänen-Deletion gleiche Phänotypen zeigen. Trotzdem kann zu diesem Zeitpunkt diese Möglichkeit nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Von besonderem Interesse ist auch die unterschiedliche Ausprägung der *rom2*-Mutation in verschiedenen Hefestämmen (siehe 3.1.1.9). Ein solches Verhalten wurde bereits von Jacoby (1997) in seiner Dissertation beschrieben. Dort war in Kreuzungen der *ubk1*-Mutante mit einem nicht-isogenen Wildtyp-Stamm zwar eine 2:2-Spaltung für die Koffein-Sensitivität beobachtet worden, nicht aber für die Temperatur-Sensitivität. Damals wurde dieses Verhalten auf die unterschiedlichen Stammhintergründe der verwendeten Stämme zurückgeführt. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Sowohl die nachgebaute *ubk1*-Mutation als auch die Vollängen-*rom2*-Deletion führt in den beiden Stämmen MCY-7B und CH1113 zu unterschiedlichen Wachstumsphänotypen. Auch in der Literatur finden sich widersprüchliche Daten in bezug auf die Phänotypen von *rom2*-Mutanten. So beobachteten Ozaki *et al.* (1996), daß die  $\Delta rom2$ -Mutante nicht mehr bei 33°C wachsen konnte und schon bei 20°C langsamer als der Wildtyp wuchs. Die von Manning *et al.* (1997) beschriebene  $\Delta rom2$ -Mutante wuchs nicht bei 11°C und 37°C und auch bei 23°C langsamer als der Wildtyp. Im Gegensatz dazu beobachteten Schmidt *et al.* (1997) bei  $\Delta rom2$ -Mutanten ein schlechteres Wachstum bei 25°C und 30°C im Vergleich zum Wildtyp, während diese Mutanten bei 37°C nahezu wie der Wildtyp wuchsen. Nach den hier vorgelegten Daten verhält sich die *rom2*-Mutation in dem Stamm CH1113 eher wie bei Ozaki *et al.* (1996) und bei Manning *et al.* (1997) beschrieben, während eine gleich konstruierte Deletionsmutante im Stamm MCY-7B eher der von Schmidt *et al.* (1997) beschriebenen gleicht.

Unterschiedliche Empfindlichkeiten verschiedener Deletionsstämmen, je nach verwendetem Wildtypstamm, wurden schon früher beschrieben. Manche Autoren machen einen

omnipotenten Suppressor *SSD1* (suppressor of *SIT4* deletion) dafür verantwortlich. Dieses Gen supprimiert Mutationen im *SIT4*-Gen, das für eine Untereinheit einer Phosphatase kodiert. Daher wurde ihm eine Phosphatase-Funktion zugeschrieben, indem es mögliche Substrate von Sit4p auch dephosphorylieren kann oder als positiver Regulator einer anderen Phosphatase agiert (Sutton *et al.*, 1991). Einen Zusammenhang zum Pkc1p-Weg ergaben Daten, die zeigten, daß die Deletion von *SSD1* den Phänotyp von  $\Delta mpk1$ - oder  $\Delta rlm1$ -Mutanten verstärkt bzw. Mutanten des Pkc1p-Weges supprimieren kann (Costigan *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 1995). Die genaue Funktion dieses Proteins ist jedoch immer noch unklar. So wurde *SSD1* in vielen weiteren Studien identifiziert und ist dadurch unter vielen Synonymen bekannt, wie *SSL1*, *SRK1*, *MCS1*, *LUC10*, und *ORE2* (Costigan *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1991; Sutton *et al.*, 1991; Uesono *et al.*, 1994; Fortes *et al.*, 1999; Ibeas *et al.*, 2000).

Es existieren mindestens 2 verschiedene Allele in den herkömmlich verwendeten Laborstämmen, das *ssdl-d*-Allel (*d* für "deletion of *SIT4* dead") und das *SSD1-y*-Allel (*y* für "deletion of *SIT4* viable") (Sutton *et al.*, 1991), so daß die Stämme CH1113 und MCY-22D durchaus verschiedene Allele dieses Gens tragen könnten. Worin sich die beiden Allele genau unterscheiden, ist nicht bekannt. Daher wäre eine Charakterisierung des *SSD1*-Allels in unseren Stämmen relativ aufwendig. In jüngerer Zeit konnten aber seine RNA-bindenden Eigenschaften gezeigt werden (Uesono *et al.*, 1997), so daß man spekulieren könnte, daß dieses Protein eine Funktion bei der Stabilisierung oder beim Abbau von RNA hat. Eine derartige Funktion könnte auch erklären, warum das *SSD1*-Gen so viele Mutationen supprimieren kann.

Es ist nicht nur auffällig, daß die Phänotypen von Mutanten, die sich vom Stamm MCY-7B oder CH1113 ableiten, sich in ihrer Ausprägung unterscheiden, sondern daß die Gesamtmenge des Mpk1-Proteins in Abkömmlingen des Stammes MCY-7B viel stärker variiert (Abbildung 3.41), während sich im Stamm CH1113 kaum Schwankungen zeigen (Abbildung 3.40). Diese Schwankungen könnten auf eine Protein-Stabilisierung, eine mRNA-Stabilisierung oder auf eine stärkere transkriptionelle Induktion des *MPK1*-Gens zurückzuführen sein. Auch hierin kann eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Ausprägung der Phänotypen der *rom2*-Mutanten gesehen werden. Experimente, die zwischen diesen Möglichkeiten unterscheiden würden, konnten aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt werden. Transkriptom-Daten weisen jedoch darauf hin, daß eine Induktion des Pkc1p-Weges zu einer verstärkten Expression des *MPK1*-Gens führt. So findet man bei Inkubation bei erhöhter Temperatur (39°C) eine 1,35-fache Induktion (Roth *et al.*, 1998), bei Überproduktion eines aktivierten Pkc1-Proteins eine 2,3-fache und bei Überproduktion eines aktivierten Rho1-Proteins eine 1,59-fache Induktion der *MPK1*-Transkription (Roberts *et al.*, 2000). Auch Daten von Jung und Levin (1999) zeigten, daß *MPK1* verstärkt bei einem aktivierten Pkc1p-Weg exprimiert wird. Aufgrund dieser Daten scheint es auf jeden Fall zu einer Veränderung der mRNA-Menge zu kommen, sei es durch mRNA-Stabilisierung oder durch stärkere transkriptionelle Induktion. Über die Möglichkeit der Protein-Stabilisierung machen diese Daten jedoch keine Aussage.

Neben der Identifizierung des *UBK1*-Gens als *ROM2* konnte hier weiter gezeigt werden, daß die Menge an doppelt phosphoryliertem Mpk1-Protein in *rom2*-Mutanten erhöht ist (Abbildung 3.40 und 3.41). Ebenso ist die Fähigkeit von Rlm1p, Zielgene des Pkc1p-Weges transkriptionell zu aktivieren, verstärkt (Abbildung 3.42). Dies ist ein überraschendes Ergebnis, da eine solche Erhöhung der Mpk1-Phosphorylierung bisher nur bei Mutanten gefunden wurde, die Defekte in Komponenten hatten, die den Weg negativ regulieren (Martín *et al.*, 2000). Dieser Befund wird unter 4.1.2.6 eingehend diskutiert.

### 4.1.2 Das Lrg1-Protein als neue Komponente der Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktion in *S.cerevisiae*

Der zweite Teil der Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung eines weiteren Mutanten-Stammes, des Stammes Y1-1. Bei diesem Stamm handelte es sich um die *ubk1*-Mutante, die aber nach einer Transposon-Mutagenese ihre charakteristischen Merkmale, wie die Lyse ohne osmotische Stabilisatoren, verloren hatte. Die Lokalisierung des Transposon ergab eine Integration auf Chromosom IV in den für eine GAP-Domäne kodierenden Bereich eines Gens namens *LRG1*. GAP-Domänen sind für **G**TPase-**a**ktivierende **P**roteine (**GAP**) charakteristische Domänen. Eine erneute Deletion des *LRG1*-Gens zeigte, daß die Deletion von *LRG1* zur Suppression der Phänotypen der *ubk1*-Mutanten führte (Abbildung 3.13). Schon die Deletion des nur für die GAP-Domäne kodierenden Bereichs reichte für eine Suppression aus. Somit trägt die Y1-1-Mutante eine Suppressor-Mutation. Auf Abbildung 3.13 ist zu sehen, daß der Stamm Y1-1 trotzdem ein wenig besser wächst als die nachher erzeugten Mutanten-Stämme. Dies könnte auf das spontane Auftreten einer weiteren Mutation im Stamm zurückzuführen sein. Die Mutante wurde auf Koffein-haltigem Medium erhalten und war damit einer strengen Selektion ausgesetzt. Dies begünstigt das Auftreten von Mutationen, die eine Koffein-Resistenz bewirken. Dabei sind zum einen Mutationen in Promotoren von Genen möglich, deren erhöhte Expression zu einer Koffein-Resistenz führt. Darunter fällt z.B. das Gen *SNQ2*. *SNQ2* kodiert für einen Plasmamembranständigen "Multidrug-ATP-Transporter" (Servos *et al.*, 1993; Decottignies *et al.*, 1995) und wurde als Hochkopienzahl-Suppressor der Koffein-Sensitivität der *slt2-D35*-Mutanten isoliert (Martín *et al.*, 2000). Eine andere Möglichkeit sind Mutationen in Genen, deren Deletion eine Koffein-Resistenz verursacht, wie *CRM1*, *ECM37*, *RRD1*, *BUD8*, *MKS1*, *SSK2* und *MSN1* (Lussier *et al.*, 1997; Rempola *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 1998). Da Koffein auf die Zelle eine pleiotrope Wirkung hat (Beach *et al.*, 1985; Parsons *et al.*, 1988; Zaborowska und Zuk, 1990) ist nicht klar, warum Pkc1p-Weg-Mutanten Koffein-sensitiv sind. Deshalb ist es schwierig zu untersuchen, worauf die höhere Resistenz des Y1-1-Stammes im Vergleich zu  $\Delta lrg1 \Delta rom2$ -Mutanten beruht. Aus diesem Grund und der Tatsache, daß die Deletion des *LRG1*-Gens im Wesentlichen für die Suppression der Phänotypen der *ubk1*-Mutanten verantwortlich ist, wurde dem Grund für die noch weiter erhöhte Koffein-Resistenz des Stammes Y1-1 im Vergleich zur *ubk1 \Delta lrg1*-Doppelmutanten in dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen.

#### 4.1.2.1 Die Einordnung von Lrg1p innerhalb der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion

Eine genetische Analyse sollte zeigen, ob es sich bei der Suppressionsfähigkeit der Deletion von *LRG1* um einen spezifischen Effekt für Mutanten mit Defekten oberhalb von Bck1p handelt oder um eine allgemeine Suppression, die ein Umgehen der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion ermöglicht. Die Deletion von *LRG1* supprimierte dabei nicht nur die Phänotypen der *ubk1*-Mutanten, sondern auch die Wachstumsdefekte einer vollständigen *rom2*-Deletion und einer *slg1*-Deletion. Dagegen wurden die Wachstumsdefekte von Mutanten mit Defekten in der Proteinkinase C oder in Komponenten der MAP-Kinase-Kaskade selbst nicht unterdrückt (siehe Tabelle 3.4). Auf den ersten Blick scheint die Tatsache, daß die Deletion von *LRG1* die *rho1-104*-Mutante nicht supprimieren kann, nicht vereinbar mit einer Wirkung von Lrg1p oberhalb von Pkc1p. Dies ist jedoch verständlich, wenn man die Eigenarten der *rho1-104*-Mutanten betrachtet. Zum einen wurde publiziert (Drgonová *et al.*, 1999), daß die Menge an mutantern Rho1-Protein sowohl unter permissiven als auch restriktiven Bedingungen in dieser Mutanten stark reduziert ist. Auch wurde gezeigt, daß in *rho1-104*-Stämmen Mpk1p unter Pkc1p-Weg-aktivierenden Bedingungen nicht mehr phosphoryliert wird (Martín *et al.*, 2000). Dies deutet eine erhöhte Instabilität des Rho1-Proteins in diesem Mutanten-Stamm an. Wirkt Lrg1p als GTPase-aktivierendes Protein auf Rho1p, dann kann es die Phänotypen nur supprimieren, wenn das Protein noch in ausreichender Menge vorhanden ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Fähigkeit zur Suppression durch die Deletion von *LRG1* spezifisch für Mutanten mit Defekten in Komponenten ist, die oberhalb der Proteinkinase C agieren. Dies legt die Möglichkeit nahe, daß Lrg1p als negativer Regulator oberhalb der Proteinkinase C in den Weg eingreift.

#### 4.1.2.2 Die Rolle der anderen GTPase-aktivierenden Proteine Sac7p, Bem2p und Bag7p bei der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion

Lrg1p gehört aufgrund seiner strukturellen Merkmale zu einer Familie von **GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP)**, zu denen auch Sac7p, Bag7p, Bem2p, Bem3p, Rgd1p, Rga1p und Rga2p zählen. Während Bem3p und Rga1p auf die kleine GTPase Cdc42p wirken (Zheng *et al.*, 1994; Stevenson *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996), die Funktion von Rga2p unklar ist und Rgd1p als GAP für Rho3p und Rho4p beschrieben ist (Doignon *et al.*, 1999), wurde für Bem2p, Sac7p und Bag7p eine Funktion als GAP für Rho1p postuliert (Peterson *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt und Hall, 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit hatte sich gezeigt, daß die Deletion von *LRG1* die *rom2*-Mutanten effizient supprimiert, und eine Domänen-Analyse des Lrg1-Proteins legte nahe, daß es sich um ein GTPase-aktivierendes Protein handeln könnte. Auch die Deletionen der für die bereits postulierten GTPase-aktivierenden Proteine Sac7p, Bem2p und Bag7p kodierenden Gene sollten damit die Fähigkeit besitzen, Phänotypen von  $\Delta rom2$ -Mutanten zu supprimieren. Die Analyse dieser Deletionsmutanten ergab jedoch, daß nur die Deletion von *SAC7* dazu befähigt war (Abbildung 3.29, 3.31, 3.33). Auch Schmidt *et al.* beobachteten bereits 1997, daß die Deletion von *SAC7* in  $\Delta rom2$ -Mutanten deren Phänotypen supprimiert. Da für Sac7p bereits seine GTPase-aktivierenden Eigenschaften auf Rho1p gezeigt waren (Schmidt *et al.*, 1997), deutete dies an, daß es sich bei Lrg1p auch um ein auf Rho1p wirkendes GAP handelt. Eine Tetradenanalyse zeigte, daß die gleichzeitige Deletion von *LRG1* und *SAC7* zu einer synthetischen Letalität führt (Abschnitt 3.1.2.9; Tabelle 3.5). Diese synthetische Letalität ließe sich erklären, wenn beide Proteine die ausschließlichen GTPase-aktivierenden Proteine für Rho1p sind. Durch den gleichzeitigen Ausfall sollte es zu einem Überfluß an GTP-gebundenem Rho1p kommen, der dann möglicherweise für die Zellen tödlich ist. Dieses Modell steht in gutem Einklang mit früheren Studien, in denen gezeigt wurde, daß die Überexpression des Wildtyp-*RHO1*-Gens auf einem Niedrigkopienzahl-Vektor unter Kontrolle des *GALI*-Promotors schon zu einer Wachstumshemmung führt (Espinet *et al.*, 1995). Ebenso ist die Expression des hyperaktiven *RHO1*-Allels in niedriger Kopienzahl toxisch für die Zellen (Schmidt *et al.*, 1997) bzw. verleiht ihnen einen Wachstumsnachteil in Abhängigkeit von dem verwendeten Allel (Madaule *et al.*, 1987).

Die Beobachtung, daß nur die Deletion von *LRG1* oder *SAC7* die Lyse von *rom2*-Mutanten supprimieren kann, und daß die gleichzeitige Deletion dieser beiden Gene synthetisch letal ist, deutet daher an, daß Lrg1p und Sac7p die funktionell wichtigsten GTPase-aktivierenden Proteine für Rho1p sind. Damit stellt sich aber die Frage, ob Bag7p und Bem2p, wie bisher vermutet, überhaupt auf Rho1p wirken.

Bei Bag7p könnte es sich durchaus trotzdem um ein auf Rho1p wirkendes GAP handeln, da die Deletion zwar keinen Effekt auf eine *rom2*-Mutante hat, die Phänotypen der *rom2*-Mutante aber auch nicht verstärkte (Abbildung 3.33). Möglicherweise hat dieses Protein eine Aktivität, die weder so hoch ist, daß deren Ausfall eine Mutation des GDP/GTP-Austauschfaktors Rom2p kompensieren kann, noch hoch genug ist, um einen gleichzeitigen Ausfall von Lrg1p und Sac7p kompensieren zu können. Eine solche niedrige Aktivität geht auch mit den von Schmidt *et al.* (1997) publizierten Daten einher. Nur die Überexpression von *BAG7* konnte dort die Kälte-Sensitivität einer  $\Delta sac7$ -Mutanten komplementieren. Gegen eine GTPase-aktivierende Funktion von Bag7p auf Rho1p spricht allerdings der Befund von

Martín *et al.* (2000), die zeigten, daß in *bag7*-Mutanten die Menge an doppelt phosphoryliertem Mpk1-Protein (als Maß für die Pkc1p-Weg-Aktivierung) nicht erhöht ist. Für Bem2p spricht, daß in einem GTPase-Assay mit der GAP-Domäne von Bem2p seine GTPase-aktivierende Funktion auf Rho1p gezeigt werden konnte. Auch zeigten Martín *et al.* (2000), daß in *bem2*-Mutanten die Menge an phosphoryliertem Mpk1-Protein erhöht ist. Falls Bem2p zur Verstärkung der GTP-Hydrolyse durch Rho1p beiträgt, kann dieser Beitrag aber nur minimal sein, da er die Letalität beim gleichzeitigen Verlust von Lrg1p und Sac7p nicht kompensieren kann.

Die hier für  $\Delta bem2$ -Mutanten gefundenen Daten sprechen aber eher gegen eine GTPase-aktivierende Funktion von Bem2p auf Rho1p. Im Gegensatz zur Deletion von *SAC7* oder *LRG1* in  $\Delta rom2$ -Stämmen, führt die gleichzeitige Deletion von *BEM2* und *ROM2* sogar zu einem stärkeren Wachstumsdefekt im Vergleich zu den entsprechenden Einfachmutanten (Abbildung 3.31). Gleiches wurde auch schon für die Benomylsensitivität der Doppelmutanten im Vergleich zu den Einfachmutanten beschrieben (Manning *et al.*, 1997). Dies kann verschiedene Gründe haben: Bem2p ist ein großes Protein von 2167 Aminosäuren mit einer auffallenden Domänenstruktur. Mit Hilfe des Programmes SMART finden sich neben der GAP-Domäne von Aminosäure 1978- 2163 noch eine Signalsequenz von Aminosäure 1-43, eine Ras GEF-Domäne von Aminosäure 592-860, eine Domäne, die normalerweise der RasGEF-Domäne vorhergeht von Aminosäure 1119-1291, drei mögliche Transmembrandomänen von Aminosäure 412-432, 1473-1493 und 1536-1556, eine "Coiled-Coil"-Domäne von Aminosäure 1724-1755 und eine PH-Domäne von Aminosäure 1791-1950 (Abbildung 3.30; Ponting *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2000). Aufgrund dieser komplexen Domänenstruktur könnte Bem2p an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt sein. Der zusätzliche Verlust der Funktionen, die von diesen Domänen übernommen werden, könnte stärker sein als die Funktion zur Aktivierung der GTP-Hydrolyse, so daß möglicherweise die Suppressionsfähigkeit durch die anderen Effekte überlagert wird. Eine Beteiligung von Bem2p an vielen verschiedenen zellulären Prozessen wird auch durch die vielen verschiedenen "Screens" nahegelegt, in denen Bem2p identifiziert wurde: die Deletion des *BEM2*-Gens ist synthetisch letal mit  $\Delta msb1$ -Mutanten (Bender und Pringle, 1991), aber auch mit einer ganzen Reihe anderer Mutanten (Wang und Bretscher, 1995; Peterson *et al.*, 1994). Mutationen im kodierenden Gen verursachen Polyploidie (Chan und Botstein, 1993) und einen thermosensitiven autolytischen Defekt (Cid *et al.*, 1998), während das Wildtyp-Gen *cdc55*-Mutanten supprimieren kann (Healy *et al.*, 1991).

Eine weitere Beobachtung, die gegen eine Funktion von Bem2p auf Rho1p spricht, sind die Phänotypen, die *bem2*-Mutanten zeigen. Sie lysieren (Abbildung 3.31; Cid *et al.*, 1998) wie andere Pkc1p-Weg-Mutanten (z.B.  $\Delta pkc1$ ,  $\Delta bck1$  und  $\Delta mpk1$ -Mutanten; Torres *et al.*, 1991; Lee und Levin, 1992; Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini *et al.*, 1992). Auch eine Sensitivität der *bem2*-Mutanten gegenüber Agenzien, die mit Komponenten der Zellwand oder ihrer Biosynthese interagieren, wie beispielsweise "Calcofluor White", Papulacandin B oder Echinocandin B, wurde beschrieben (Cid *et al.*, 1998). Solche Phänotypen wurden bisher noch nie bei Mutanten mit Defekten in Komponenten, die den Pkc1p-Weg negativ regulieren, beschrieben. Diese sind eher Kälte-sensitiv, wie beispielsweise die  $\Delta sac7$ -Mutante (Dunn und Shortle, 1990). Auch der Befund, daß Bender und Pringle (1991) *BEM3* als Suppressor einer *bem2*-Mutanten isolierten, legt eher die Möglichkeit nahe, daß Bem2p und Bem3p überlappende Funktionen haben und damit beide auf Cdc42p wirken.

Die Ergebnisse der vorliegenden Suppressionsstudie gehen auch mit Beobachtungen von Cabib *et al.* (1998) einher, die bei der Aufreinigung von Rho1p in *bem2*- *bem3*-, *rga1* und *lrg1*-Einfachmutanten immer noch GTPase-aktivierende Aktivität auf Rho1p zeigte. Dieser Befund ist erklärbar mit der Existenz mehrerer GTPase-aktivierender Proteine für ein Rho-Protein. Nach der hier durchgeführten genetischen Analyse sollte es sich bei diesen für Rho1p um das Lrg1- und das Sac7-Protein handeln.

#### 4.1.2.3 Lrg1p als mögliches neues GTPase-aktivierendes Protein für Rho1p

Als Nachweis für eine Interaktion zwischen Lrg1p und einem G-Protein der Rho-Familie wurde hier das "Two-Hybrid"-System verwendet. Für das GAP Sac7p konnte mit diesem System zwar keine Interaktion mit dem Wildtyp-Rho1-Protein gezeigt werden, aber es fand sich eine Interaktion mit einer mutierten Variante des Rho1-Proteins (Rho1p-Q68H/C206S) (Schmidt *et al.*, 1997). Ein analoger Austausch im Ras-Protein führt zu einem Protein mit stark verringerter GTPase-Aktivität (Der *et al.*, 1986). Die veränderte Variante des Rho1-Proteins sollte damit auch ein Protein mit verringerter GTPase-Aktivität darstellen und somit eine die Zielproteine-dauernd aktivierende Variante. Mit dieser Variante konnte hier eine Interaktion mit einer verkürzten Form des Lrg1-Proteins (AS 568-1017) gezeigt werden (Abbildung 3.38), während eine andere Verkürzung des Lrg1-Proteins (AS 753-1017), das Lrg1-Vollängen-Protein oder eine C-terminale Verkürzung (AS1-579) keine Interaktion zeigten (auf Histidin-freiem Medium). Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase als Reporter erwies sich hier als schwierig, da das mutierte Rho1-Protein eine hohe Hintergrund-Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase hervorruft.

Bei Betrachtung des Wachstums auf Histidin-freiem Medium, als auch bei Betrachtung der Stärke der Blaufärbung als Maß für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, deutet sich an, daß es sich hierbei um eine sehr schwache Interaktion handelt. Schwache Wechselwirkungen finden sich häufig bei regulatorischen Proteinen, da starke Interaktionen eher irreversibel wären und keine Möglichkeit der Regulation mehr zuließen. Die Beobachtung, daß das Lrg1-Vollängen-Protein keine Interaktion mit dem daueraktiven Rho1-Protein zeigt, könnte auf eine hemmende Funktion der LIM-Domänen hindeuten (siehe 4.1.2.4).

Eine Auffälligkeit der "Two-Hybrid"-Experimente ist, daß nur eine verkürzte Version des Lrg1-Proteins mit dem daueraktiven Rho1p interagiert. Ähnliche Daten wurden auch schon für Interaktionen zwischen anderen Proteinen erhalten. So steigt die Stärke der Interaktion des verkürzten Proteins im Vergleich zum Vollängen-Protein, wenn man die Interaktionsdomäne kartiert hat. Dies wurde schon bei den Proteinen p110 und p85 (zwei Untereinheiten der Phosphatidylinositol-3-Kinase) gezeigt (Holt *et al.*, 1994). Unterschiedliche Stärken der Wechselwirkungen können aber auch auf Unterschiede in der Proteinestabilität oder auf die Effizienz des Kernimports der verschiedenen Fusionsproteine zurückzuführen sein (Fields und Sternglanz, 1994). Welcher dieser Gründe hier für das unterschiedliche Verhalten der Fusionsproteine verantwortlich ist, wurde nicht weiter untersucht. Eine Western-Analyse oder Lokalisierungsstudien könnten dazu näheren Aufschluß geben.

Bei dem Test auf Wechselwirkung von Rho5p mit Lrg1p konnte bei keinem der getesteten Reporter-Gene eine Transkriptionsaktivierung als Hinweis auf eine Interaktion gefunden werden (Tabelle 3.7). Die Funktion von Rho5p ist bisher noch nicht geklärt. Es häufen sich aber Daten, daß es sich bei Rho5p um einen negativen Regulator des Pkc1p-Weges oder um einen positiven Regulator des HOG-Weges handelt (Hans-Peter Schmitz und Stefanie Huppert, persönliche Mitteilung). Somit ist hier eine Interaktion zwischen Lrg1p und Rho5p eher unwahrscheinlich.

Neben einer Interaktion von Lrg1p mit Rho1p und Rho5p wurde auch dessen Wechselwirkung mit den anderen kleinen GTPasen der Rho-Familie, Rho2p, Rho3p, Rho4p und Cdc42p untersucht (Tabelle 3.8). Dieser Test erwies sich als besonders schwierig, da die verwendeten Plasmide, die für die Fusionsproteine aus *lexA* und den Mitgliedern der Rho-Familie kodierten, immer eine hohe Hintergrund-Aktivität der Reportergene, sowohl bei der Produktion der  $\beta$ -Galaktosidase, beim Wachstum auf Histidin-freiem Medium als auch beim Wachstum auf Platten ohne Histidin und mit 3-Aminotriazol als Inhibitor des *HIS3*-Genproduktes, schon bei Abwesenheit eines potentiellen Interaktionspartners zeigten (Tabelle 3.8). Diese hohe Hintergrundaktivität, zeigte sich auch bereits bei der Arbeit von Imamura *et al.* (1997), die die Interaktion des Proteins Bnr1p mit Rho4p untersuchten. Hier hob sich die Stärke der Expression der Reporter-Gene jedoch sichtbar gegen das hohe Basallevel ab. Da

sich bei den hier getesteten Varianten des Lrg1-Proteins mit den Rho2p-, Rho3p-, Rho4p- und Cdc42p-Varianten keine sichtbaren Unterschiede zu den Negativ-Kontrollen zeigten, ist eine Wechselwirkung bei den hier getesteten Proteinen eher unwahrscheinlich.

Eine mögliche Interaktion zwischen Lrg1p und Rho2p wäre noch zu erwarten gewesen, da Rho1p und Rho2p wahrscheinlich funktionell überlappen und auf Aminosäure-Ebene eine Identität von 53% zeigen (Madaule *et al.*, 1987). So können beispielsweise das *RHO1*- und das *RHO2*-Gen in hoher Kopienzahl *Δrom2*-Mutanten gut supprimieren, während das *RHO3*- oder das *RHO4*-Gen in hoher Kopienzahl nur schwach und *CDC42* dies nicht können (Ozaki *et al.*, 1996). Außerdem komplementiert das *RHO2*-Gen in hoher Kopienzahl die Defekte einer dominant-negativen *rho1*-Mutanten (Ozaki *et al.*, 1996). Gegen eine Interaktion von Lrg1p mit Rho2p spricht jedoch die Unfähigkeit einer *lrg1*-Deletion, die *rho1-104*-Mutante zu supprimieren. Da *RHO2* eine dominant-negative *rho1*-Mutante in hoher Kopienzahl komplementieren kann, sollte bei einer Wirkung von Lrg1p auf Rho2p das Rho2-Protein bevorzugt in der GTP-gebundenen Form vorliegen. Dies sollte dann zur Komplementation der *rho1-104*-Mutanten führen, womit auch die Deletion von *LRG1* zur Suppression von dieser ausreichen sollte. Da dies aber nicht der Fall ist, scheint Lrg1p spezifisch auf Rho1p zu wirken.

Neben der "Two-Hybrid"-Analyse wurde auch noch versucht, die Interaktion zwischen dem Lrg1-Protein und dem Rho1-Protein durch gemeinsame Aufreinigung und/oder Koimmunpräzipitation biochemisch nachzuweisen (Abbildung 3.39 und nicht gezeigte Daten). Mithilfe dieser beiden Methoden konnte jedoch keine Interaktion, trotz Einsatz von nicht-hydrolysierbarem GTP zur Stabilisierung eines möglichen Komplexes, nachgewiesen werden. Dies ist wohl hauptsächlich auf eine hohe Instabilität des Lrg1-Proteins zurückzuführen. Da die Überexpression des Lrg1-Proteins insbesondere bei hoher Temperatur toxisch für die Zellen ist (Abbildung 3.37), sollte dieses Protein für zukünftige Bindungsstudien besser heterolog in einem anderen Organismus exprimiert werden, um ein stabiles Lrg1-Protein zu erhalten. Auch besteht die Möglichkeit, daß man bei Verwendung der mutierten Version des Rho1-Proteins eine mögliche Interaktion besser sieht. Möglicherweise ist die Interaktion aber auch zu schwach, um diese *in vitro* nachweisen zu können. Auch andere Arbeitsgruppen konnten bisher keine direkte Bindung für die in Hefe vorkommenden Rho-GTPase-aktivierenden Proteine an ihre Rho-Proteine über *in vitro*-Bindungsstudien zeigen.

#### 4.1.2.4 Die Domänenstruktur von Lrg1p

Die Analyse des Lrg1-Proteins mithilfe des Programmes SMART zeigt eine charakteristische Domänen-Struktur (Abbildung 3.14; Schultz *et al.*, 1998; Ponting *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000). Im N-terminalen Teil dieses Proteins finden sich drei mögliche LIM-Domänen. Der Name "LIM" geht zurück auf die drei ersten Proteine, in denen dieses Motiv gefunden wurde, *lin-11* aus *C.elegans*, *ISL1* aus der Ratte und *mec-3* aus *C.elegans*. Bei diesem Motiv handelt es sich um eine Zink-Finger-Domäne (Sánchez-García und Rabbitts, 1994), für die bisher jedoch noch keine Bindung an DNA gezeigt werden konnte, sondern nur ihre Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen (Bach, 2000). Die Konsensus-Sequenz lautet [(C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>17±1</sub>-H-X<sub>2</sub>-C)-X<sub>2</sub>-(C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>17±1</sub>-C-X<sub>2</sub>-C/D/H)], wobei von dieser Domäne zwei Zink-Ionen komplexiert werden. LIM-Domänen-Proteine sind u.a. an der Zytoskelett-Organisation, an der Zelldifferenzierung und der Organ-Entwicklung beteiligt (Dawid *et al.*, 1995; Bach, 2000). Sie lassen sich in drei Gruppen ordnen (Dawid *et al.*, 1998; Bach, 2000). In die erste Gruppe gehören die LIM-Homeo-Domänen-Proteine und die LIM-Kinase-Proteine. Proteine dieser Gruppe tragen eine Homeo- oder eine Kinase-Domäne kombiniert mit einer oder mehreren LIM-Domänen und sind meist im Kern lokalisiert. "LIM-only"-Proteine bilden die zweite Gruppe. Hierzu zählen Proteine, die sich ausschließlich aus LIM-Domänen, meist aus

einer bis fünf, zusammensetzen. Sie sind meist im Zytoplasma lokalisiert. Die dritte Gruppe umfaßt Proteine, die die unterschiedlichsten Domänen mit LIM-Domänen in einem Protein kombiniert haben und sich keiner der anderen Gruppen zuordnen lassen. In diese letzte Gruppe fällt auch das Lrg1-Protein von *S.cerevisiae*, da es die außergewöhnliche Kombination von drei LIM-Domänen mit einer C-terminalen Rho-GAP-Domäne enthält. Eine Kombination von LIM-Domänen mit einer Rho-GAP-Domäne findet man nach SMART nur bei zwei anderen Proteinen der Bäckerhefe, dem Rga1- und dem Rga2-Protein (Schultz *et al.*, 1998; Ponting *et al.*, 1999; Schultz *et al.*, 2000) und wurde für das Rga1-Protein auch schon publiziert (Chen *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1995). Auch in zwei hypothetischen Proteinen SPBC3F6.05 und SPBC28E12.03 aus *Schizosaccharomyces pombe* findet sich noch diese Kombination (Information aus PombePD, <http://www.proteome.com/databases/index.html>). In der Bäckerhefe gibt es noch zwei weitere Proteine, die LIM-Domänen enthalten. Zum einen findet sich das hypothetische Protein, Ykr090p, dessen Funktion noch unbekannt ist und nur LIM-Domänen enthält. Ein weiteres interessantes Hefeprotein mit einer LIM-Domäne ist Ste5p, das in einem anderen MAP-Kinase-Weg (Paarung) als "Gerüstprotein" wirkt. Es wurde gezeigt, daß die LIM-Domäne sowohl für die Funktionalität als auch für die Bindung an das Fus3-Protein nötig ist (Choi *et al.*, 1994). Ferner konnten Feng *et al.* (1998) zeigen, daß die LIM-Domäne von Ste5p auch G $\beta$  bindet, um die Aktivierung der MAP-Kinase-Kinase-Kinase Ste11p zu ermöglichen.

Da bei anderen LIM-Domänen ihre Funktion für eine Proteininteraktion gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, daß dies auch auf die LIM-Domänen des Lrg1-Proteins zutrifft. Dies liegt vor allem nahe, da die Deletion des vollständigen *LRG1* und auch die ausschließliche Deletion der GAP-Domäne-kodierenden Region zu unterschiedlichen Wachstumsphänotypen führt. Nur die Deletion der GAP-Domäne zeigte eine Koffein- und Kongorot-Sensitivität (Abbildung 3.16). Dies könnte bedeuten, daß nicht nur die GAP-Domäne eine negativ regulierende Funktion hat, sondern daß die verbleibenden LIM-Domänen auch eine solche Funktion ausüben. Diese wird möglicherweise durch die Bindung an ein anderes Protein vermittelt, von dem es sich durch Fehlen der GAP-Domäne nicht mehr lösen kann.

Kürzlich wurde die Interaktion eines LIM-Domänen-Proteins mit einem Integrin-Rezeptor beschrieben (Wixler *et al.*, 2000). So wären mögliche Kandidaten einer der Sensoren Slg1p oder Mid2p, für die eine Funktion ähnlich den Integrinen vermutet wird. Auch diesem Ansatz wurde durch "Two-Hybrid"-Analysen nachgegangen. Es konnte jedoch keine Interaktion zwischen Teilen des Lrg1-Proteins und den zytoplasmatischen Teilen des Slg1- und des Mid2-Proteins gezeigt werden. Möglicherweise wird die Zugänglichkeit der LIM-Domänen für interagierende Proteine durch die Fusion an die Gal4-Aktivierungsdomäne behindert, was dann die Funktionalität des Fusionsproteins beeinflußt. Dies würde auch erklären, warum keines der Konstrukte, die für N-terminale Fusionsproteine kodieren, funktionell war.

Daß das Lrg1-Protein möglicherweise zwei Funktionen innerhalb der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion einnimmt, legt auch der Nachweis des zweifach-phosphorylierten Mpk1-Proteins nahe. Während die vollständige Deletion bei 37°C zu einem sechsfachen Anstieg im Vergleich zum Wildtyp führt, zeigt die GAP-Domänen-Deletion nur eine etwa dreifache Erhöhung (Abbildung 3.42). Dies könnte bedeuten, daß zum einen die GAP-Domäne einen negativ-regulierenden Effekt auf den Pkc1p-Weg hat, indem sie dem Rho1-Protein hilft, sein gebundenes GTP zu hydrolysieren. Zum anderen könnte dies weiter bedeuten, daß die LIM-Domänen auch einen negativ regulierenden Effekt haben, da durch deren zusätzliche Deletion die Aktivität des Weges unter induzierenden Bedingungen noch weiter ansteigt.

Hinweise auf eine weitere Funktion von Lrg1p neben seiner GTPase-aktivierenden Funktion werden auch gestützt von der Beobachtung, daß die Deletion von *LRG1* die Phänotypen der *rho1-104*-Mutanten verstärkt. Wirkt Lrg1p nur auf Rho1p, sollte der Ausfall von diesem den Phänotyp einer *rho1-104*-Mutanten nicht beeinflussen, da das Lrg1-Protein dann keine weiteren Interaktionspartner und damit auch keine weiteren Funktionen hätte.

In diesem Zusammenhang wäre die Identifizierung weiterer Interaktionspartner sehr aufschlußreich.

#### 4.1.2.5 Die Funktion von Lrg1p und Sac7p in der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion

Da sowohl die Suppressionsanalysen, die "Two-Hybrid"-Analysen als auch die Tatsache, daß die gleichzeitige Deletion von *LRG1* und *SAC7* synthetisch letal ist, darauf hindeuteten, daß Lrg1p und Sac7p überlappende Funktionen in der Zelle übernehmen, wurde nach Unterschieden in ihren Eigenschaften gesucht. Erste Hinweise auf Unterschiede in ihrer Funktion kamen aus Untersuchungen zur Suppression einer *tor2-21*-Mutanten durch die *lrg1*-Deletion (Abbildung 3.36). Die Deletion von *LRG1* reicht nicht aus, um eine *tor2-21* Mutante mit Defekten in der Tor2p-spezifischen Funktion zu supprimieren (siehe 3.1.2.9.1), im Gegensatz zu einer *sac7*-Deletion (Schmidt *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis zeigt, daß Lrg1p und Sac7p nicht vollkommen identische Funktionen haben können.

Ein weiterer Hinweis auf spezifische Funktionen der beiden GTPase-aktivierenden Proteine Sac7p und Lrg1p kamen aus Überexpressionsstudien. Die Überexpression des *SAC7*-Gens führt zur Hemmung des Wachstums (Abbildung 3.37). Dies wurde auch schon von Akada *et al.* (1997) beschrieben. Die Tatsache, daß diese Wachstumshemmung nicht durch die Zugabe osmotischer Stabilisatoren aufgehoben werden kann (siehe Abbildung 3.37), legt nahe, daß die Überexpression nicht zu einer Zelllyse führt. Die Überexpression von *LRG1* führt auch zu einer Wachstumshemmung bei höherer Temperatur (39°C). Diese läßt sich aber im Gegensatz zur Wachstumshemmung durch eine *SAC7*-Überexpression durch Zugabe von 1M Sorbit wieder aufheben (Abbildung 3.37). Dies läßt vermuten, daß die Überexpression von *LRG1* eine Lyse der Zellen hervorruft.

Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Lrg1p und Sac7p nicht vollkommen identische Funktionen in der Zelle ausüben.

Damit stellen sich zwei Fragen: 1. Warum braucht eine Rho-GTPase überhaupt mehrere GTPase-aktivierende Proteine? und 2. Welche Funktionen übernehmen Lrg1p und Sac7p?

Eine Erklärung für die Existenz mehrerer GTPase-aktivierender Proteine für ein Rho-Protein liegt möglicherweise in der Vielzahl von Zielproteinen auf die letztere wirken (Bishop und Hall, 2000). Auch für Rho1p der Hefe sind zahlreiche Zielproteine beschrieben, wie Pkc1p, Fks1p, Bni1p, Skn7p und möglicherweise Bem4p (siehe Abbildung 4.1; Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996; Drgonová *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996; Alberts *et al.*, 1998; Hirano *et al.*, 1996; siehe auch 1.1.1.5). Als Folge könnten verschiedene "Pools" des Rho1-Proteins in der Zelle existieren (Helliwell *et al.*, 1998b). Die Autoren kamen zu dieser Ansicht aufgrund der Beobachtung, daß Mutanten mit einem Defekt in der Tor2p-spezifischen Funktion nur durch Pkc1p oder andere Komponenten des MAP-Kinase-Moduls (Mpk1p, Mkk1p und Bck1-20p) supprimiert werden können. Alle anderen Zielproteine von Rho1p (Skn7p, Bni1p und Fks1p) können dies jedoch nicht. So könnte man sich vorstellen, daß jeder "Pool" von Rho1p für jedes seiner Zielproteine ein spezifisches GAP benötigt.

Ein mögliches Modell wäre, daß Lrg1p als GAP auf Rho1p wirkt, um spezifisch seine Funktion als regulatorische Untereinheit des Glucansynthase-Komplexes zu beeinflussen. Dafür spricht zum einen die erhöhte Resistenz von  $\Delta$ *lrg1*-Mutanten gegen Kongorot, einem Farbstoff, der die Biogenese des stützenden  $\beta$ -1,3-D-Glucans stört (Kopecká und Gabriel, 1992). Auch die Beobachtung, daß bei einer *LRG1*-Überexpression eine Lyse der Zellen eintritt, unterstützt diese Hypothese. Bei einer Überexpression von *LRG1* läge Rho1p vorwiegend in der GDP-gebundenen Form vor und könnte dann nicht mehr den Glucansynthase-Komplex aktivieren. Dies würde zu einer verringerten Glucansynthase-Aktivität führen mit der Folge einer geschwächten Zellwand, die bei hypoosmolaren Bedingungen zur Zelllyse führt.

Im Gegensatz dazu könnte Sac7p für die Funktion von Rho1p das Aktin-Zytoskelett zu regulieren zuständig sein. Diese Funktion wird vor allem von dem Rho1p-Zielprotein Pkc1p vermittelt (Helliwell *et al.*, 1998b). Andere Gruppen diskutieren aber auch die Beteiligung von Bni1p an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts (Kohno *et al.*, 1996). Für eine Beteiligung von Sac7p an der Aktin-Regulation sprechen auch Daten von Dunn und Shortle (1990), die zeigten, daß *sac7*-Deletionen Kälte-sensitiv sind und bei restriktiver Temperatur keine korrekten "Aktinkabel" mehr bilden. Sie isolierten die Null-Allele des *SAC7*-Gens als Suppressoren von Mutanten, die die Temperatur-sensitiven Aktin-Allele *act1-1* und *act1-4* trugen. In Kombination mit den Allelen *act1-2* ist die *sac7*-Deletion jedoch letal (Dunn und Shortle, 1990). Auch die Fähigkeit einer *sac7*-Deletion die Aktin-Defekte einer *tor2-21*-Mutanten zu supprimieren, unterstreicht die Funktion von Sac7p bei der Aktin-Regulation.

Eine Beteiligung von Lrg1p an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts ist dagegen eher unwahrscheinlich, da die Deletion von *LRG1* nicht die Aktin-Defekte der *tor2-21*-Mutanten supprimieren kann. Auch zeigen  $\Delta$ *lrg1*-Mutanten als auch Zellen, die das *LRG1*-Gen überexprimieren, keine Defekte in der De- oder Repolarisierung von Aktin bei und nach dem Umsetzen der Zellen auf höhere Temperatur (37°C) (Daten nicht gezeigt und Hans-Peter Schmitz, persönliche Mitteilung).

Eine andere Erklärung zur Existenz mehrerer GTPase-aktivierender Proteine für ein Rho-Protein könnten aber auch verschiedene Stimuli sein, die immer nur ein bestimmtes GAP aktivieren. Da über die Regulation von Sac7p und Lrg1p bisher keine Daten vorliegen, wäre auch hier die Isolierung interagierender Proteine ein vielversprechender Ansatz.

Aus diesen Daten ergibt sich das in Abbildung 4.1 gezeigte Modell.

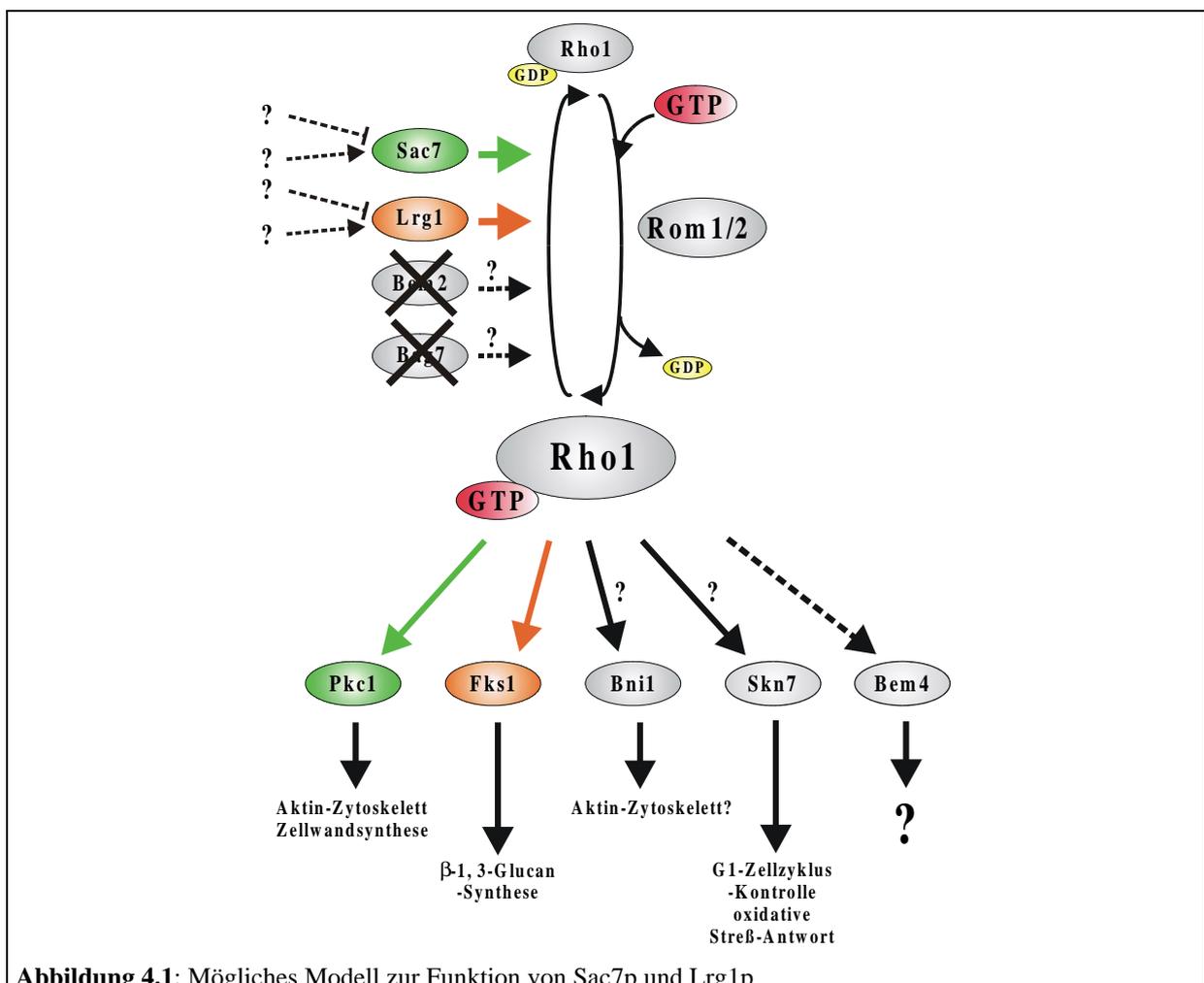


Abbildung 4.1: Mögliches Modell zur Funktion von Sac7p und Lrg1p

#### 4.1.2.6 Mpk1-Phosphorylierung in den Mutanten und abgeleitetes Modell

In dieser Arbeit wurde neben der Charakterisierung zweier unbekannter Mutanten auch die Mpk1-Phosphorylierung in verschiedenen Deletionsmutanten untersucht. So zeigte sich in  $\Delta slg1$ -Mutanten eine Beeinträchtigung in der Hitze-induzierten Aktivierung des Weges (Abbildung 3.41). Im Gegensatz dazu konnten Martín *et al.* (2000) bei den in ihrem Experiment verwendeten *slg1*-Mutanten keine Erniedrigung der Mpk1-Phosphorylierung feststellen. Möglicherweise beruhen diese abweichenden Ergebnisse auf den unter 4.1.1 erläuterten Stammunterschieden. Die hier gemachten Beobachtungen gehen jedoch mit den Phänotypen von *slg1*-Mutanten einher, da diese in manchen Stämmen Temperatur-abhängig lysieren. Durch die gleichzeitige Deletion von *LRG1* kann die verminderte Phosphorylierung wieder aufgehoben werden. Damit müßte Lrg1p als negativer Regulator unterhalb von Slg1p wirken.

Ein besonders überraschendes Ergebnis ergab der Nachweis der Phosphorylierung in der  $\Delta rom2$ - oder der *ubk1*-Mutanten. Obwohl für Rom2p eine positive Regulationsfunktion innerhalb der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion postuliert wird, zeigten diese Mutanten eine extrem erhöhte Phosphorylierung des Mpk1-Proteins (Abbildung 3.40 und 3.41). Diese Beobachtung ließe sich zum einen mit der möglichen Existenz eines parallelen Aktivierungsmechanismus des Pkc1p-Weges erklären, der unter Bedingungen, wenn Rom2p fehlt, besonders aktiv ist, jedoch bei Anwesenheit von Rom2p von diesem gehemmt wird. Da noch nicht bekannt ist, ob die Aktivierung des Weges durch Slg1p oder Mid2p über Rom2p läuft oder diese beiden direkt die Proteinkinase C oder die MAP-Kinase-Kaskade aktivieren, sind diese Sensoren gute Kandidaten für einen alternativen Aktivierungsmechanismus (Abbildung 4.2A).

Eine zweite Möglichkeit wäre, daß bei dem Pkc1p-Weg eine negative Rückkopplung existiert, die sicherstellt, daß der Weg auch wieder deaktiviert werden kann. Ein "feedback loop" wurde bereits von Paravicini und Friedli (1996) postuliert, als diese eine unerwartete Interaktion zwischen Pkc1p und Mkk1p im "Two-Hybrid"-System fanden. Sie interpretierten dies so, daß Mkk1p möglicherweise mit Pkc1p interagiert, um die Aktivierung des Weges wieder abzuschwächen.

Auch Soler *et al.* (1995) postulierten eine Rückkopplung, da die regulatorischen Domänen von Mkk1p und Mkk2p mit Mpk1p interagieren. So erklärten sie diese Tatsache mit der Möglichkeit, daß die regulatorische Domäne zur Substraterkennung benötigt wird, oder für eine Rückkopplung eingesetzt wird, bei der Mpk1p wiederum Mkk1p und/oder Mkk2p phosphoryliert.

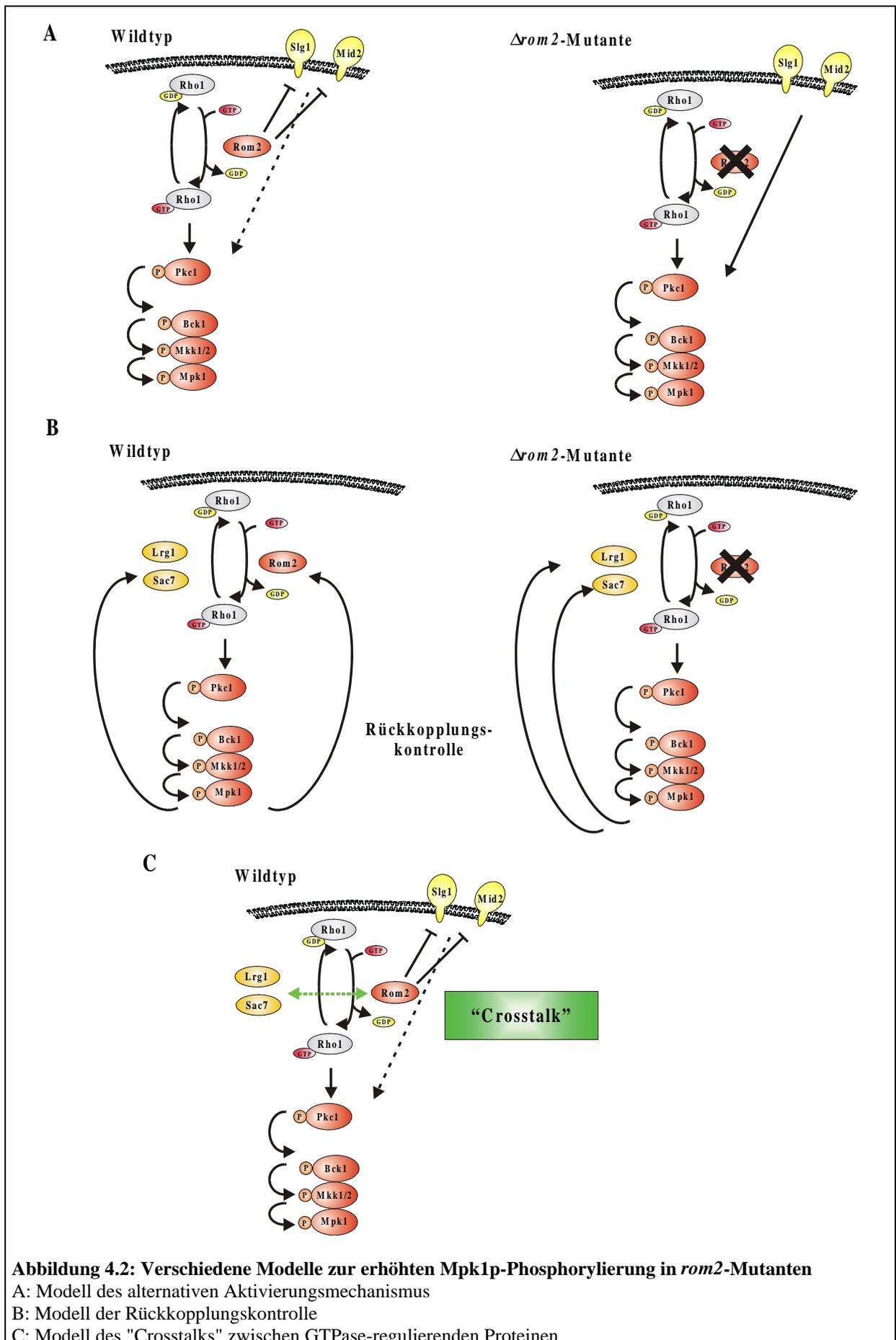
Auch andere Autoren postulieren eine negative "Feedback-Kontrolle" (Martín *et al.*, 2000). Sie untersuchten die Phosphorylierung des katalytisch inaktiven Mpk1-Proteins Slt2F54p. Dieses Protein wurde bei 24°C unter nicht-aktivierenden Bedingungen stärker phosphoryliert als das Wildtyp-Protein. Gleiches zeigte sich auch bei einem anderen inaktiven Mpk1D35-Protein. Bei gleichzeitigem Einbringen eines Wildtyp-*MPK1*-Allels zeigte sich jedoch wieder ein Wildtyp-Phosphorylierungsmuster, so daß man davon ausgehen muß, daß für die negative Kontrolle ein funktionelles Mpk1-Protein vorhanden sein muß. Damit gehen auch Daten von Kamada *et al.* (1995) einher, die zeigten, daß Mpk1p bei 24°C im Kern lokalisiert, bei 37°C jedoch im Zytoplasma. Diese sich ändernde Lokalisierung könnte die Phosphorylierung von zytoplasmatischen Proteinen, die an der Rückkopplungs-Kontrolle beteiligt sind, zur Folge haben.

Ein Arbeitsmodell für die hier vorgelegten Daten wäre, daß beim Fehlen von Rom2p diese Kontrolle gestört ist. Rom2p könnte ein Ziel dieser "Feedback"-Kontrolle sein, da es ein Serin-reiches Protein ist, so daß viele mögliche Phosphorylierungsstellen für Kinasen vorhanden sind. Tatsächlich wird das Rom2-Protein, nach neuesten Erkenntnissen von der MAP-Kinase des Weges, dem Mpk1-Protein, phosphoryliert (M.Hall, persönliche Mitteilung und S.Vidan und M.Snyder, persönliche Mitteilung). Damit wird möglicherweise die Rom2p-Aktivität vom Pkc1p-Weg selbst reguliert. Durch das Fehlen von Rom2p würde die Aktivität anderer Proteine (wie z.B. von Lrg1p), durch erhöhte Phosphorylierung so verändert, daß der Weg vollkommen dereguliert ist. Diese Hypothese würde auch erklären, warum die gleichzeitige Deletion von *LRG1* die erhöhte Mpk1p-Phosphorylierung in *rom2*-Mutanten wieder reduzieren kann. Das Lrg1-Protein nimmt damit nicht nur eine negativ-regulierende Kontrolle im Pkc1p-Weg ein, sondern reguliert in der *rom2*-Mutante den Weg positiv. Ein mögliches Modell gibt Abbildung 4.2B wieder.

Eine dritte Möglichkeit, die erklären würde, warum die Deletion von *LRG1* die Deletion von *ROM2* sowohl phänotypisch als auch bei der Mpk1p-Phosphorylierung kompensieren kann, könnte in einem "Crosstalk" zwischen dem Rho1p-regulierenden GEF Rom2p und den GTPase-aktivierenden Proteinen Lrg1p und Sac7p liegen (Abbildung 4.2C).

Auch eine Kombination aller drei Modelle ist denkbar.

Abschließend ist festzuhalten, daß es sich bei der Signaltransduktion über den Pkc1p-Weg nicht um einen linearen Ablauf von Aktivierungen durch Phosphorylierung handeln kann, sondern daß ein komplexes Netzwerk vorliegt, bei dem Komponenten am Ende der Signalkette auch wieder Rückmeldungen an obere Komponenten geben.



**Abbildung 4.2: Verschiedene Modelle zur erhöhten Mpk1p-Phosphorylierung in *rom2*-Mutanten**

A: Modell des alternativen Aktivierungsmechanismus

B: Modell der Rückkopplungskontrolle

C: Modell des "Crosstalks" zwischen GTPase-regulierenden Proteinen

## 4.2 Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktionsweg in *Kluyveromyces lactis*

Um weitere Einblicke in die Abläufe von Signaltransduktionswegen zu erhalten, ist es häufig von großem Nutzen, homologe Gene und ihre Produkte aus anderen Organismen zu identifizieren. Durch Sequenzvergleiche lassen sich häufig funktionell wichtige Domänen aufgrund ihrer hohen Konservierung, aber auch abweichende Domänen, die die Spezifität des Proteins für den einzelnen Organismus ausmachen, identifizieren. Diese Strategie hat man sich auch bei der Pkc1p-vermittelten Signaltransduktion zu Nutze gemacht. So wurden bereits zahlreiche zum *PKC1*-Gen aus *S.cerevisiae* homologe Gene identifiziert, wie das *pck1*<sup>+</sup>- und das *pck2*<sup>+</sup>-Gen aus *Schizosaccharomyces pombe* (Toda *et al.*, 1993), das *CaPKC1*-Gen aus *Candida albicans* (Paravicini *et al.*, 1996) oder *KIPKC1* aus *K.lactis* (J.Heinisch, persönliche Mitteilung).

Auch Homologe des *BCK1*-Gens konnten isoliert werden, so das *KIBCK1*-Gen aus *K.lactis* (Jacoby *et al.*, 1999), das *NPK1*-Gen aus Tabak (Banno *et al.*, 1993) oder das Säuger-MAP-Kinase-Kinase-Kinase (Blumer *et al.*, 1994), ebenso wie das XMEK2 als *Xenopus*-Homologes des *MKK1*-Gens (Yashar *et al.*, 1993).

Weiterhin konnten zahlreiche für Mpk1p-homologe Proteine kodierende Gene isoliert werden, so z.B. das *MKC1*-Gen (MAP kinase of C.*albicans*) aus *C.albicans* (Navarro-García *et al.*, 1995; Navarro-García *et al.*, 1998), das *pmk1*<sup>+</sup>-Gen aus *S.pombe* (Toda *et al.*, 1996), das *MMK2*-Gen aus Alfalfa (Jonak *et al.*, 1995), das *MPKA*-Gen aus *Aspergillus nidulans* (Bussink und Osmani, 1999), das *MPS1*-Gen aus *Magnaporthe grisea* (Xu *et al.*, 1998), *PIM1* (P.*pastoris* cell integrity MAPK) aus *Pichia pastoris* (M. Molina, persönliche Mitteilung) oder das ERK2-Gen aus *Xenopus* (Lee *et al.*, 1993).

### 4.2.1 Expression von *KIMPCK1* in *K.lactis* und *S.cerevisiae*

In unserem Labor konnte das für die MAP-Kinase kodierende Gen *KIMPCK1* aus *K.lactis* über Komplementation der *S.cerevisiae*  $\Delta mpk1$ -Mutanten isoliert werden (Kirchrath *et al.*, 2000). Das abgeleitete Protein zeigt 70% Identität zum ScMpk1-Protein und kann den Verlust des ScMpk1p in entsprechenden Mutanten vollständig komplementieren. Nähere Analysen zeigten, daß im Gegensatz zu dem *S.cerevisiae* *MPK1*-Gen (Mizunuma *et al.*, 1998) die Überexpression von *KIMPCK1* nicht zu einer verminderten Wachstumsrate der Zellen führt (J.Heinisch, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtung könnte zwei Gründe haben. Zum einen bestand die Möglichkeit, daß das Gen unter den verwendeten Bedingungen nicht effizient überexprimiert wurde. Eine andere Möglichkeit war, daß die Überexpression von *KIMPCK1* sowohl in *S.cerevisiae* als auch in *K.lactis* tatsächlich keinen sichtbaren Defekt verursacht. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde eine Western-Analyse durchgeführt (Abbildung 3.44). Dabei konnte das chromosomal kodierte KIMpk1-Protein trotz vierfach aufgetragener Menge an Gesamt-Protein nicht nachgewiesen werden. Erst eine Überexpression des *KIMPCK1*-Gens unter Kontrolle des durch Galaktose-induzierbaren *GALI*-Promotors ergab Mengen des KIMpk1-Proteins, sowohl in *K.lactis* als auch in *S.cerevisiae*, die sich mit dem verwendeten Antikörper nachweisen ließen. Dies spiegelt eine sehr schlechte Kreuzreaktivität des gegen das ScMpk1-Protein gerichteten Antikörpers mit KIMpk1p wieder. Obwohl das ScMpk1p und das KIMpk1p eine hohe Identität von 70% aufweisen, ist diese schlechte Kreuzreaktion erklärbar. Vergleicht man die N-terminalen 66% der Proteine miteinander (Aminosäure 1-356 von KIMpk1p und Aminosäure 1-354 von ScMpk1p) weisen diese Teile sogar eine Identität von 87% auf, während sich die Identität zwischen den C-terminalen Dritteln der Proteine auf nur noch 32% beschränkt. Möglicherweise enthält das polyklonale Antiserum gegen ScMpk1p einen sehr hohen Anteil an gegen den C-terminalen Teil gerichteten Antikörpern, was die schlechte Kreuzreaktion bedingt.

Trotzdem kann festgehalten werden, daß das KIMpk1-Protein in *K.lactis* als auch in *S.cerevisiae* überexprimiert wurde, da sich nach Überexpression die nachgewiesene Menge

des KIMpk1-Proteins gegen die chromosomal kodierte Menge deutlich abhob (Abbildung 3.44, vergleiche Teil A, Spur 1 mit Teil A, Spur 3 und mit Teil B, Spur 3). Zusammengenommen mit der Beobachtung, daß die Überexpression von *KIMPK1* zu keinem sichtbaren Phänotyp in *K.lactis* als auch in *S.cerevisiae* führt (J.Heinisch, persönliche Mitteilung), liegt hier ein Unterschied zwischen den Mpk1-Proteinen der beiden Hefen. Worauf dieser Unterschied beruht, ist noch unklar. Eine mögliche Erklärung wäre eine erhöhte Phosphorylierung von Ziel-Proteinen, die sich in *S.cerevisiae* toxisch auswirkt, in *K.lactis* jedoch nicht. Dies könnte aber auch verbunden sein mit einer niedrigeren Aktivität von KIMpk1p in *S.cerevisiae* und/oder *K.lactis*. Da in *K.lactis* noch keine direkten Zielproteine von KIMpk1p identifiziert wurden, kann erst eine Identifizierung und eine anschließende Analyse dieser Zielproteine Klarheit darüber geben.

#### 4.2.2 Phosphorylierung von Mpk1p in $\Delta Klbck1$ -Mutanten

Bereits in vorherigen Studien (Jacoby *et al.*, 1999) wurde gezeigt, daß die Deletion von *BCK1* in *K.lactis* zu keinem sichtbaren Phänotyp führt. Dies steht im Gegensatz zu  $\Delta KImpk1$ -Mutanten. Diese zeigen neben einer Sensitivität gegen 5mM Koffein auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegen 0,1mg/ml "Calcofluor White" und erhöhte Temperatur (37°C) (Kirchrath *et al.*, 2000).

Diese Unterschiede in der Ausprägung ihrer Phänotypen könnte erklärt werden durch die Existenz eines Proteins, das die Funktion von Bck1p in der Zelle übernehmen kann. Daher wurde untersucht, ob das Mpk1-Protein in einer  $\Delta Klbck1$ -Mutanten noch phosphoryliert wird. Mit Hilfe einer Western-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers der gegen ein synthetisches Phospho-Threonin/Tyrosin-Peptid der humanen MAP-Kinase p44/p42 gerichtet ist, sollte das bereits für *S.cerevisiae* etablierte System bei *K.lactis*-Stämmen angewendet werden. Durch geeignete Verdünnungen der verwendeten Antikörper wurde dies auch erreicht. Der Nachweis der doppelt phosphorylierten Form des KIMpk1-Proteins ergab, daß in  $\Delta Klbck1$ -Mutanten kein phosphoryliertes Protein mehr nachzuweisen war, während sich im Wildtyp sogar bei 25°C bei Anwesenheit von Sorbit eine Phosphorylierung zeigte, die sich bei 37°C und ohne osmotische Stabilisatoren weiter erhöhte (Abbildung 3.45). Dieses Experiment zeigt zum einen, daß in *K.lactis*, genau wie *S.cerevisiae*, der Pkc1p-Weg durch erhöhte Temperatur induziert wird. Desweiteren ergibt sich hieraus, daß das offensichtliche Fehlen der Mpk1p-Phosphorylierung keinen nachweisbaren Wachstumsdefekt in  $\Delta Klbck1$ -Mutanten verursacht. Vielmehr führt das vollständige Fehlen des KIMpk1-Proteins zu den Pkc1p-Weg-typischen Wachstumsdefekten der  $\Delta KImpk1$ -Mutanten. Daraus kann man schließen, daß nicht nur der phosphorylierten Form von Mpk1p eine Funktion in der Zelle zukommt, sondern auch dem nicht-phosphorylierten Protein.

Auch in *S.cerevisiae* zeigte sich ein Unterschied in der Ausprägung von  $\Delta bck1$ - und  $\Delta mpk1$ -Mutanten. Während  $\Delta Scbck1$ -Mutanten bei 30°C noch ohne osmotische Stabilisatoren wachsen konnten (Abbildung 3.23), ist dies den  $\Delta mpk1$ -Mutanten nicht mehr möglich (Abbildung 3.25). Ebenso wird in *S.cerevisiae* für die Aktivierung von Mpk1p das Bck1-Protein benötigt. Kamada *et al.* (1995) zeigten, daß in einer  $\Delta bck1$ -Mutanten das Mpk1-Protein keine Proteinkinase-Aktivität mehr zeigt, ebenso wenig wie das Mpk1-Protein einer Temperatur-sensitiven *pkc1-2*-Mutanten.

Sowohl die in dieser Arbeit gewonnenen Daten in *K.lactis*, als auch die publizierten Daten von *S.cerevisiae* sprechen für eine Funktion des Proteins, die nicht mit dessen Phosphorylierungszustand oder seiner Proteinkinase-Aktivität in Zusammenhang steht. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine noch nicht identifizierte Funktion, die vom C-Terminus des Proteins vermittelt wird. Für den C-terminalen Teil des Proteins konnte sowohl in *S.cerevisiae* als auch in *K.lactis* eine Transkriptions-aktivierende Eigenschaft gezeigt werden (Soler *et al.*, 1995; Kirchrath *et al.*, 2000). Ferner sind *Scmpk1*-Mutanten, die den für

den C-Terminus von Mpk1p kodierenden Teil deletiert haben, Koffein-sensitiv, aber resistenter gegen "Calcofluor White" (Kirchrath *et al.*, 2000).

Auch Analysen homologer Mpk1-Proteine anderer Organismen stützen die Hypothese einer wichtigen Funktion des C-Terminus für das Mpk1-Protein. So zeigte sich für Deletionsmutanten des *PIMI*-Gens (*MPK1* homologes Gen aus *Pichia pastoris*) ein Zellyse-Defekt. Trotz hoher Homologie zum *S.cerevisiae* *MPK1*-Gen kann dieses jedoch nicht eine *S.cerevisiae*  $\Delta$ *mpk1*-Mutante komplementieren (M.Molina, persönliche Mitteilung). Da die Homologie im C-terminalen Bereich des Proteins besonders niedrig ist, könnte dies der Grund für die fehlende Komplementation sein. Damit würde nicht nur eine wichtige Funktion des Mpk1-Proteins vom C-terminalen Teil des Proteins vermittelt, sondern auch die Spezifität in verschiedenen Hefen.

Abschließend läßt sich festhalten, daß ein System zum indirekten Nachweis der Pkc1p-Weg-Aktivität in *K.lactis* etabliert wurde. Zum anderen ergeben sich aus den Analysen von *K.lactis* Hinweise auf eine mögliche, noch nicht identifizierte Funktion von MAP-Kinasen.

## 5. Zusammenfassung

Die Architektur von Signal-übertragenden MAP-Kinase-Kaskaden, deren Störung z.B. zur Krebsentstehung beiträgt, ist in Eukaryonten von der Hefe bis hin zum Menschen hoch konserviert. Der hier untersuchte, über die Proteinkinase C (Pkc1p)-vermittelte Weg in *S.cerevisiae* reguliert die Zellwandbiosynthese, das Aktinzytoskelett und die Wahrnehmung von Nährstoffen im Medium. Pkc1p aktiviert ein MAP-Kinase-Modul und wird dazu selbst durch Bindung an die kleine GTPase Rho1p in ihrer GTP-gebundenen Form aktiviert. Ob Rho1p in seiner aktiven, GTP-gebundenen oder seiner inaktiven, GDP-gebundenen Form vorliegt, hängt von der Wirkung der GDP/GTP-Austauschfaktoren Rom2p und Rom1p, sowie von dem GDP-Dissoziations-Inhibitor Rdi1p und den GTPase-aktivierenden Proteinen Sac7p, Bem2p und möglicherweise Bag7p ab.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine bisher nicht näher charakterisierte Mutante (*ubk1*) mit einer Mutation im *ROM2*-Gen beschrieben werden. Diese führt zu einer Verkürzung des aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Proteins am C-terminalen Ende in einer sogenannten "PH-Domäne". Die Phänotypen dieser Mutanten gleichen denen eines Stammes mit einer vollständigen *rom2*-Deletion. Damit wurde gezeigt, daß die PH-Domäne für die *in vivo*-Funktion von Rom2p essentiell ist.

Eine als Suppressor von *ubk1*-Stämmen isolierte Mutante konnte hier auf die Insertion eines Transposons im *LRG1*-Gen zurückgeführt werden. Die Deletion von *LRG1* führt zu einer Suppression von *rom2*-Mutanten, aber auch von Mutanten, die Defekte in dem potentiellen Zellwandsensor Slg1p haben. Defekte in Komponenten der MAP-Kinase-Kaskade oder der Proteinkinase C selbst werden dagegen nicht supprimiert. Diese Suppressionsstudie erlaubte die Einordnung des Lrg1-Proteins innerhalb des Pkc1p-Weges oberhalb der Proteinkinase C. Homologievergleiche von Lrg1p deuteten an, daß dieses wahrscheinlich für ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) kodiert. Diese Daten wurden als Hinweis gewertet, daß Lrg1p ein weiteres GAP für das oberhalb von Pkc1p wirkende Rho1-Protein sein könnte. Im "Two Hybrid"-System konnte eine schwache Wechselwirkung beider Proteine über die GAP-Domäne von Lrg1p gezeigt werden. Wie bei gleichzeitiger Deletion von *LRG1* und *ROM2* konnte hier auch für *sac7 rom2*-Doppeldeletionen eine Suppressionswirkung gezeigt werden. Dagegen zeigte die Deletion von *BAG7* in Verbindung mit einer *rom2*-Mutanten keinen Effekt und eine gleichzeitige Deletion von *BEM2* in *rom2*-Mutanten verstärkte die Wachstumsdefekte. Da die gleichzeitige Deletion von *LRG1* und *SAC7* eine synthetische Letalität zeigt, festigen alle diese Daten die Hypothese, daß es sich bei Lrg1p und Sac7p um die wesentlichen GTPase-aktivierenden Proteine von Rho1p handeln muß.

Darüber hinaus konnten Unterschiede in der Funktion beider Proteine in bezug auf die Wirkung von Mutanten mit Defekten in der für Tor2p-spezifischen Funktion gefunden werden. Auch in ihrem Verhalten bei Überexpression verhielten sich *LRG1* und *SAC7* verschieden: Beide führen zwar zu einer Wachstumshemmung, die sich aber nur bei Lrg1p-Überproduktionsstämmen durch osmotische Stabilisatoren kompensieren läßt.

Aus den vorgelegten Daten wurde ein neues Modell für die Regulation von Rho1p abgeleitet. Danach sind Lrg1p und Sac7p die funktionell wichtigsten GTPase-aktivierenden Proteine für Rho1p, während die Wirkung von Bag7p und Bem2p eher fraglich ist. Da für Rho1p unterschiedliche Funktionen beschrieben sind, legt die Existenz verschiedener Regulatorproteine für diesen molekularen Schalter die Vermutung nahe, daß verschiedene Funktionen des Rho1-Proteins durch jeweils ein bestimmtes GAP reguliert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ahn, N. G., Seger, R. und Krebs, E. G. (1992). The mitogen-activated protein kinase activator. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **4**, 992-999.
- Akada, R., Yamamoto, J. und Yamashita, I. (1997). Screening and identification of yeast sequences that cause growth inhibition when overexpressed. *Mol.Gen.Genet.* **254**, 267-274.
- Alberts, A. S., Bouquin, N., Johnston, L. H. und Treisman, R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein  $\beta$  subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J.Biol.Chem.* **273**, 8616-8622.
- Alvarez, P., Sampedro, M., Molina, M. und Nombela, C. (1994). A new system for the release of heterologous proteins from yeast based on mutant strains deficient in cell integrity. *J.Biotechnol.* **38**, 81-88.
- Andrews, P. D. und Stark, M. J. R. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J.Cell.Sci.* **113**, 2685-2693.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M. A. und Paravicini, G. (1994). Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J.Biol.Chem.* **269**, 16821-16828.
- Arvanitidis, A. und Heinisch, J. J. (1994). Studies on the function of yeast phosphofructokinase subunits by *in vitro* mutagenesis. *J.Biol.Chem.* **269**, 8911-8918.
- Bach, I. (2000). The LIM domain: regulation by association. *Mech.Dev.* **91**, 5-17.
- Banno, H., Hirano, K., Nakamura, T., Irie, K., Nomoto, S., Matsumoto, K. und Machida, Y. (1993). NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11, and Byr2 protein kinases. *Mol.Cell.Biol.* **13**, 4745-4752.
- Banuett, F. (1998). Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 249-274.
- Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F. und Hall, M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol.Biol.Cell* **7**, 25-42.
- Bartel, P. L., Chien, C. T., Sternglanz, R. und Fields, S. (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In 'Cellular interactions in development: a practical approach.' (Ed. D. A. Hartley.) pp. 153-79. (Oxford University Press: Oxford.)
- Baudin, A., Ozier, K. O., Denouel, A., Lacroute, F., and Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic.Acids.Res.* **21**, 3329-3330.
- Beach, D., Rodgers, L. und Gould, J. (1985). *ran1*<sup>+</sup> controls the transition from mitotic division to meiosis in fission yeast. *Curr.Genet.* **10**, 297-311.
- Bender, A. und Pringle, J. R. (1991). Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **11**, 1295-1305.
- Bickle, M., Delley, P.-A., Schmidt, A. und Hall, M. N. (1998). Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.* **17**, 2235-2245.
- Bishop, A. L. und Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* **348 Part 2**, 241-255.
- Blomberg, N., Baraldi, E., Nilges, M. und Saraste, M. (1999). The PH superfold: a structural scaffold for multiple functions. *Trends.Biochem.Sci.* **24**, 441-445.
- Blumer, K. J., Johnson, G. L. und Lange-Carter, C. A. (1994). Mammalian mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MEKK) can function in a yeast mitogen-activated protein kinase pathway downstream of protein kinase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 4925-4929.
- Botstein, D., Falco, S. C., Stewart, S. E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D. T., Struhl, K. und Davis, R. W. (1979). Sterile host yeasts (SHY): a eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**, 17-24.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Brash, D. E. und Haseltine, W. A. (1982). UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots. *Nature* **298**, 189-192.
- Buehrer, B. M. und Errede, B. (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **17**, 6517-6525.
- Bulawa, C. E. (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu.Rev.Microbiol.* **47**, 505-534.
- Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P. B., Choi, E. Y., Finberg, K., Roeder, G. S. und Snyder, M. (1994). Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **8**, 1087-1105.

- Bussink, H. J. und Osmani, S. A. (1999). A mitogen-activated protein kinase (MPKA) is involved in polarized growth in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol.Lett.* **173**, 117-125.
- Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A. und Silverman, S. J. (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol.Sci.* **5**, 370-375.
- Cabib, E., Drgon, T., Drgonová, J., Ford, R. A. und Kollár, R. (1997). The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem.Soc.Trans.* **25**, 200-204.
- Cabib, E., Drgonová, J. und Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 307-333.
- Caro, L. H., Smits, G. J., van Egmond, P., Chapman, J. W. und Klis, F. M. (1998). Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiol.Lett.* **161**, 345-349.
- Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J. und Alessi, D. R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr.Biol.* **9**, 186-197.
- Castro, C., Ribas, J. C., Valdívieso, M. H., Varona, R., del Rey, F. und Durán, A. (1995). Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)  $\beta$ -D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **177**, 5732-5739.
- Chan, C. S. und Botstein, D. (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase- in ploidy mutants in yeast. *Genetics* **135**, 677-691.
- Chang, M. P., French Cornay, D., Fan, H. Y., Klein, H., Denis, C. L. und Jaehning, J. A. (1999). A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol.Cell.Biol.* **19**, 1056-1067.
- Chen, G. C., Zheng, L. und Chan, C. S. (1996). The LIM domain-containing Dbm1 GTPase-activating protein is required for normal cellular morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **16**, 1376-1390.
- Chen, X. J. (1996). Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene* **172**, 131-136.
- Choi, K. Y., Satterberg, B., Lyons, D. M. und Elion, E. A. (1994). Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**, 499-512.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O. und Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.
- Chun, K. T., Edenberg, H. J., Kelley, M. R. und Goebel, M. G. (1997). Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA. *Yeast* **13**, 233-240.
- Cid, V. J., Cenamor, R., Sánchez, M. und Nombela, C. (1998). A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene *BEM2* of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology.* **144**, 25-36.
- Cid, V. J., Durán, A., Del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. und Sánchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Rev.* **59**, 345-386.
- Costigan, C., Gehrung, S. und Snyder, M. (1992). A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol.Cell.Biol.* **12**, 1162-1178.
- Costigan, C., Kolodrubetz, D. und Snyder, M. (1994). NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast *SLT2* mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 2391-2403.
- Costigan, C. und Snyder, M. (1994). SLK1, a yeast homolog of MAP kinase activators, has a RAS/cAMP-independent role in nutrient sensing. *Mol.Gen.Genet.* **243**, 286-296.
- Cullen, P. J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B. J., Jigami, Y. und Sprague, G. F. (2000). Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**, 1005-1018.
- Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E. und Gustin, M. C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J.Biol.Chem.* **270**, 30157-30161.
- Dawid, I. B., Breen, J. J. und Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends.Genet.* **14**, 156-162.
- Dawid, I. B., Toyama, R. und Taira, M. (1995). LIM domain proteins. *C.R.Acad.Sci.III.* **318**, 295-306.
- De Bettignies, G., Barthe, C., Morel, C., Peypouquet, M. F., Doignon, F. und Crouzet, M. (1999). *RGD1* genetically interacts with *MID2* and *SLG1*, encoding two putative sensors for cell integrity signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 1719-1731.
- Decottignies, A., Lambert, L., Catty, P., Degand, H., Epping, E. A., Moye-Rowley, W. S., Balzi, E. und Goffeau, A. (1995). Identification and characterization of SNQ2, a new multidrug ATP binding cassette transporter of the yeast plasma membrane. *J.Biol.Chem.* **270**, 18150-18157.
- Delley, P.-A. und Hall, M. N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J.Cell.Biol.* **147**, 163-174.

- Der, C. J., Finkel, T. und Cooper, G. M. (1986). Biological and biochemical properties of human rasH genes mutated at codon 61. *Cell* **44**, 167-176.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R. und Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**, 680-686.
- Dirick, L., Böhm, T. und Nasmyth, K. (1995). Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 4803-4813.
- Dodou, E. und Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell.Biol.* **17**, 1848-1859.
- Dohmen, R. J., Strasser, A. W., Höner, C. B. und Hollenberg, C. P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-692.
- Doi, K., Gartner, A., Ammerer, G., Errede, B., Shinkawa, H., Sugimoto, K. und Matsumoto, K. (1994). MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **13**, 61-70.
- Doignon, F., Weinachter, C., Roumanie, O. und Crouzet, M. (1999). The yeast Rgd1p is a GTPase activating protein of the Rho3 and Rho4 proteins. *FEBS Lett.* **459**, 458-462.
- Donzeau, M., Bourdineaud, J. P. und Lauquin, G. J. (1996). Regulation by low temperatures and anaerobiosis of a yeast gene specifying a putative GPI-anchored plasma membrane protein [corrected] [published erratum appears in *Mol Microbiol* 1996 Jul; 21(2):431]. *Mol.Microbiol.* **20**, 449-459.
- Drgonová, J., Drgon, T., Roh, D. H. und Cabib, E. (1999). The GTP-binding protein Rho1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *J.Cell.Biol.* **146**, 373-387.
- Drgonová, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollár, R., Chen, G. C., Ford, R. A., Chan, C. S., Takai, Y. und Cabib, E. (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis [see comments]. *Science* **272**, 277-279.
- Dunn, T. M. und Shortle, D. (1990). Null alleles of *SAC7* suppress temperature-sensitive actin mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **10**, 2308-2314.
- El-Sherbeini, M. und Clemas, J. A. (1995). Nikkomycin Z supersensitivity of an echinocandin-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob.Agents.Chemother.* **39**, 200-207.
- Elorza, M. V., Rico, H. und Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J.Gen.Microbiol.* **129**, 1577-1582.
- Errede, B., Cade, R. M., Yashar, B. M., Kamada, Y., Levin, D. E., Irie, K. und Matsumoto, K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol.Reprod.Dev.* **42**, 477-485.
- Errede, B. und Levin, D. E. (1993). A conserved kinase cascade for MAP kinase activation in yeast. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **5**, 254-260.
- Espinet, C., De La Torre, M. A., Aldea, M. und Herrero, E. (1995). An efficient method to isolate yeast genes causing overexpression-mediated growth arrest. *Yeast* **11**, 25-32.
- Espinoza, F. H., Ogas, J., Herskowitz, I. und Morgan, D. O. (1994). Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science* **266**, 1388-1391.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal.Biochem.* **132**, 6-13.
- Feng, Y., Song, L. Y., Kincaid, E., Mahanty, S. K. und Elion, E. A. (1998). Functional binding between G $\beta$  and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr.Biol.* **8**, 267-278.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fields, S. und Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends.Genet.* **10**, 286-292.
- Fortes, P., Kufel, J., Fornerod, M., Polycarpou, S. M., Lafontaine, D., Tollervey, D. und Mattaj, I. W. (1999). Genetic and physical interactions involving the yeast nuclear cap-binding complex. *Mol.Cell.Biol.* **19**, 6543-6553.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K. und Takai, Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell.* **9**, 1221-1233.
- Gabriel, M. und Kopecká, M. (1995). Disruption of the actin cytoskeleton in budding yeast results in formation of an aberrant cell wall. *Microbiology* **141**, 891-899.
- Garcia-Ranea, J. A. und Valencia, A. (1998). Distribution and functional diversification of the *ras* superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **434**, 219-225.
- Garrett-Engle, P., Moilanen, B. und Cyert, M. S. (1995). Calcineurin, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol.Cell.Biol.* **15**, 4103-4114.
- Gibson, T. J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M. und Birney, E. (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends.Biochem.Sci.* **19**, 349-353.

- Gietz, D., St.Jean, A., Woods, R. A. und Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic.Acids.Res.* **20**, 1425.
- Gietz, R. D. und Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-534.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. und Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes [see comments]. *Science* **274**, 546,563-546,567.
- Gray, J. V., Ogas, J. P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D. E. und Herskowitz, I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* **16**, 4924-4937.
- Guarente, L. (1993). Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 1639-1641.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. und Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 1264-1300.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. und Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic.Acids.Res.* **24**, 2519-2524.
- Hanahan, D., Jessee, J. und Bloom, F. R. (1995). Techniques for transformation of *E.coli*. In 'DNA cloning: a practical approach'. (Ed. D. M. Glover.) pp. 1-36. (IRL Press: Oxford.)
- Healy, A. M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A. E., Goebel, M., DePaoli-Roach, A. A. und Pringle, J. R. (1991). *CDC55*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol.Cell.Biol.* **11**, 5767-5780.
- Heinisch, J., Kirchrath, L., Liesen, T., Vogelsang, K. und Hollenberg, C. P. (1993). Molecular genetics of phosphofruktokinase in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol.Microbiol.* **8**, 559-570.
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H.-P. und Jacoby, J. J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **32**, 671-680.
- Helliwell, S. B., Howald, I., Barbet, N. und Hall, M. N. (1998a). TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**, 99-112.
- Helliwell, S. B., Schmidt, A., Ohya, Y. und Hall, M. N. (1998b). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr.Biol.* **8**, 1211-1214.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**, 187-197.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. und Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163-167.
- Hirano, H., Tanaka, K., Ozaki, K., Imamura, H., Kohno, H., Hihara, T., Kameyama, T., Hotta, K., Arisawa, M., Watanabe, T., Qadota, H., Ohya, Y. und Takai, Y. (1996). *ROM7/BEM4* encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **16**, 4396-4403.
- Holt, K. H., Olson, L., Moye-Rowley, W. S. und Pessin, J. E. (1994). Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high- affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 42-49.
- Huang, K. N. und Symington, L. S. (1994). Mutation of the gene encoding protein kinase C 1 stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 6039-6045.
- Ibeas, J. I., Lee, H., Damsz, B., Prasad, D. T., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A. und Narasimhan, M. L. (2000). Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. *Plant J.* **23**, 375-383.
- Igual, J. C., Johnson, A. L. und Johnston, L. H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* **15**, 5001-5013.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. und Takai, Y. (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G- proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**, 2745-2755.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N. und Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol.Cell.Biol.* **19**, 8344-8352.
- Inoue, S. B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T. und Ohya, Y. (1999). Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1,3-  $\beta$ -glucan synthase. *J.Biol.Chem.* **274**, 38119-38124.
- Irie, K., Araki, H. und Oshima, Y. (1991a). A new protein kinase, *SSP31*, modulating the *SMP3* gene-product involved in plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **108**, 139-144.
- Irie, K., Araki, H. und Oshima, Y. (1991b). Mutations in a *Saccharomyces cerevisiae* host showing increased holding stability of the heterologous plasmid pSR1. *Mol.Gen.Genet.* **225**, 257-265.

- Irie, K., Takase, M., Lee, K. S., Levin, D. E., Araki, H., Matsumoto, K. und Oshima, Y. (1993). *MKK1* and *MKK2*, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen- activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol.Cell.Biol.* **13**, 3076-3083.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. und Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* **8**, 1693-1696.
- Jacoby, J. J. (1997): Untersuchungen zum Proteinkinase C-vermittelten Signalübertragungsweg in Hefen. Dissertation
- Jacoby, J. J., Kirchrath, L., Gengenbacher, U. und Heinisch, J. J. (1999). Characterization of *KLBCK1*, encoding a MAP kinase kinase kinase of *Kluyveromyces lactis*. *J.Mol.Biol.* **288**, 337-352.
- Jacoby, J. J., Nilius, S. M. und Heinisch, J. J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol.Gen.Genet.* **258**, 148-155.
- Jacoby, J. J., Schmitz, H.-P. und Heinisch, J. J. (1997). Mutants affected in the putative diacylglycerol binding site of yeast protein kinase C. *FEBS Lett.* **417**, 219-222.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Lloyd, C., Chan, J. und Hirt, H. (1995). MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Mol.Gen.Genet.* **248**, 686-694.
- Jung, U. S. und Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol.Microbiol.* **34**, 1049-1057.
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J. und Levin, D. E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* **9**, 1559-1571.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C. P., Anraku, Y., Ohya, Y. und Levin, D. E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J.Biol.Chem.* **271**, 9193-9196.
- Kapteyn, J. C., Ram, A. F., Groos, E. M., Kollár, R., Montijn, R. C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. und Klis, F. M. (1997). Altered extent of cross-linking of  $\beta$ -1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall  $\beta$ -1,3-glucan content. *J.Bacteriol.* **179**, 6279-6284.
- Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. und Klis, F. M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim.Biophysica.Acta.General.Subjects.* **1426**, 373-383.
- Ketela, T., Brown, J. L., Stewart, R. C. und Bussey, H. (1998). Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation of the HOG pathway. *Mol.Gen.Genet.* **259**, 372-378.
- Ketela, T., Green, R. und Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J.Bacteriol.* **181**, 3330-3340.
- Khalfan, W., Ivanovska, I. und Rose, M. D. (2000). Functional interaction between the *PKC1* pathway and *CDC31* network of SPB duplication genes. *Genetics* **155**, 1543-1559.
- Kirchrath, L., Lorberg, A., Schmitz, H.-P., Gengenbacher, U. und Heinisch, J. J. (2000). Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Mol.Biol.* **300**, 743-758.
- Kitagaki, H., Shimoi, H. und Itoh, K. (1997). Identification and analysis of a static culture-specific cell wall protein, Tir1p/Srp1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* **249**, 343-349.
- Klebe, R. J., Harriss, J. V., Sharp, Z. D. und Douglas, M. G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**, 333-341.
- Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**, 851-869.
- Koch, G., Tanaka, K., Masuda, T., Yamochi, W., Nonaka, H. und Takai, Y. (1997). Association of the Rho family small GTP-binding proteins with Rho GDP dissociation inhibitor (Rho GDI) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* **15**, 417-422.
- Kohno, H., Tanaka, K., Mino, A., Umikawa, M., Imamura, H., Fujiwara, T., Fujita, Y., Hotta, K., Qadota, H., Watanabe, T., Ohya, Y. und Takai, Y. (1996). Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 6060-6068.
- Kondo, K. und Inouye, M. (1991). *TIP1*, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **266**, 17537-17544.
- Kopecká, M. (1984). Lysis of growing cells of *Saccharomyces cerevisiae* induced by papulacandin B. *Folia Microbiol.Praha.* **29**, 115-119.
- Kopecká, M. und Gabriel, M. (1992). The influence of congo red on the cell wall and (1,3)- $\beta$ -D- glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* **158**, 115-126.
- Kovacech, B., Nasmyth, K. und Schuster, T. (1996). *EGT2* gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol.Cell.Biol.* **16**, 3264-3274.

- Kowalski, L. R., Kondo, K. und Inouye, M. (1995). Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **15**, 341-353.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Last, R. L., Maddock, J. R. und Woolford-JL, J. (1987). Evidence for related functions of the RNA genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **117**, 619-631.
- Lee, B. N. und Elion, E. A. (1999). The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**, 12679-12684.
- Lee, K. S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K. und Levin, D. E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol.Cell.Biol.* **13**, 3067-3075.
- Lee, K. S. und Levin, D. E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol.Cell.Biol.* **12**, 172-182.
- Levin, D. E. und Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J.Cell.Biol.* **116**, 1221-1229.
- Levin, D. E., Bowers, B., Chen, C. Y., Kamada, Y. und Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell.Mol.Biol.Res.* **40**, 229-239.
- Levin, D. E. und Errede, B. (1995). The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr.Opin.Cell.Biol.* **7**, 197-202.
- Levin, D. E., Fields, F. O., Kunisawa, R., Bishop, J. M. und Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**, 213-224.
- Lew, D. J. und Reed, S. I. (1995). Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **5**, 17-23.
- Leza, M. A. und Elion, E. A. (1999). *POG1*, a novel yeast gene, promotes recovery from pheromone arrest via the G1 cyclin *CLN2*. *Genetics* **151**, 531-543.
- Li, S., Ault, A., Malone, C. L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L. H., Deschenes, R. J. und Fassler, J. S. (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* **17**, 6952-6962.
- Li, Y., Moir, R. D., Sethy-Coraci, I. K., Warner, J. R. und Willis, I. M. (2000). Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol.Cell.Biol.* **20**, 3843-3851.
- Lipke, P. N. und Kurjan, J. (1992). Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol.Rev.* **56**, 180-194.
- Lipke, P. N. und Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J.Bacteriol.* **180**, 3735-3740.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953-961.
- Lussier, M., White, A. M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S. B., Horenstein, C. I., Chen-Weiner, J., Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Roemer, T. W., Vo, D. H., Bondoc, D. C., Hall, J., Zhong, W. W., Sdicu, A. M., Davies, J., Klis, F. M., Robbins, P. W. und Bussey, H. (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.
- Mack, D., Nishimura, K., Dennehey, B. K., Arbogast, T., Parkinson, J., Toh-E, A., Pringle, J. R., Bender, A. und Matsui, Y. (1996). Identification of the bud emergence gene *BEM4* and its interactions with Rho-type GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **16**, 4387-4395.
- Madania, A., Poch, O., Tarassov, I., Winsor, B. und Martin, R. (1996). Analysis of a 22,956 bp region on the right arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Yeast* **12**, 1563-1573.
- Madaule, P., Axel, R. und Myers, A. M. (1987). Characterization of two members of the *rho* gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **84**, 779-783.
- Madden, K., Sheu, Y. J., Baetz, K., Andrews, B. und Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**, 1781-1784.
- Manning, B. D., Padmanabha, R. und Snyder, M. (1997). The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell.* **8**, 1829-1844.
- Marcus, S., Polverino, A., Barr, M. und 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.

- Marini, N. J., Meldrum, E., Buehrer, B., Hubberstey, A. V., Stone, D. E., Traynor-Kaplan, A. und Reed, S. I. (1996). A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of Cdc28 at START. *EMBO J.* **15**, 3040-3052.
- Martín, H., Castellanos, M. C., Cenamor, R., Sánchez, M., Molina, M. und Nombela, C. (1996). Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene *SLT2(MPK1)* rescued from yeast autolytic mutants. *Curr.Genet.* **29**, 516-522.
- Martín, H., Mendoza, A., Rodríguez-Pachón, J. M., Molina, M. und Nombela, C. (1997). Characterization of *SKM1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK-like protein kinase. *Mol.Microbiol.* **23**, 431-444.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. und Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **275**, 1511-1519.
- Masuda, T., Tanaka, K., Nonaka, H., Yamochi, W., Maeda, A. und Takai, Y. (1994). Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J.Biol.Chem.* **269**, 19713-19718.
- Mattison, C. P., Spencer, S. S., Kresge, K. A., Lee, J. und Ota, I. M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen- activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol.Cell.Biol.* **19**, 7651-7660.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. und Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *Mol.Cell.Biol.* **15**, 5671-5681.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A. und Mann, C. (1993). The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell.Biol.* **123**, 1821-1833.
- Mellor, H. und Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* **332**, 281-292.
- Mino, A., Tanaka, K., Kamei, T., Umikawa, M., Fujiwara, T. und Takai, Y. (1998). Shs1p: a novel member of septin that interacts with spa2p, involved in polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **251**, 732-736.
- Mirzayan, C., Copeland, C. S., and Snyder, M. (1992). The *NUF1* gene encodes an essential coiled-coil related protein that is a potential component of the yeast nucleoskeleton. *J.Cell.Biol.* **116**, 1319-1332.
- Mizunuma, M., Hirata, D., Miyahara, K., Tsuchiya, E. und Miyakawa, T. (1998). Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* **392**, 303-306.
- Mol, P. C., Park, H. M., Mullins, J. T. und Cabib, E. (1994). A GTP-binding protein regulates the activity of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ - glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J.Biol.Chem.* **269**, 31267-31274.
- Morgan, B. A., Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S. und Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**, 1035-1044.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D. und Botstein, D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J.Cell.Biol.* **125**, 381-391.
- Muñoz-Dorado, J., Kondo, K., Inouye, M. und Sone, H. (1994). Identification of cis- and trans-acting elements involved in the expression of cold shock-inducible *TIP1* gene of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic.Acids.Res.* **22**, 560-568.
- Musacchio, A., Gibson, T., Rice, P., Thompson, J. und Saraste, M. (1993). The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *Trends.Biochem.Sci.* **18**, 343-348.
- Müller, L., Xu, G., Wells, R., Hollenberg, C. P. und Piepersberg, W. (1994). *LRG1* is expressed during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae* and contains motifs similar to LIM and rho/racGAP domains. *Nucleic.Acids.Res.* **22**, 3151-3154.
- Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J., and Jigami, Y. (1992). *OCH1* encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J.* **11**, 2511-2519.
- Navarro-García, F., Alonso-Monge, R., Rico, H., Pla, J., Sentandreu, R. und Nombela, C. (1998). A role for the MAP kinase gene *MKCI* in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology* **144**, 411-424.
- Navarro-García, F., Sánchez, M., Pla, J. und Nombela, C. (1995). Functional characterization of the *MKCI* gene of *Candida albicans*, which encodes a mitogen-activated protein kinase homolog related to cell integrity. *Mol.Cell.Biol.* **15**, 2197-2206.
- Nierras, C. R. und Warner, J. R. (1999). Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **274**, 13235-13241.
- Nilius, S. M. (1997): Isolierung und Charakterisierung von Mutanten im Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktionsweg bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit.

- Nombela, C., Molina, M., Cenamor, R. und Sánchez, M. (1988). Yeast  $\beta$ -glucanases: a complex system of secreted enzymes. *Microbiol.Sci.* **5**, 328-332.
- Nomoto, S., Watanabe, Y., Ninomiya-Tsuji, J., Yang, L. X., Nagai, Y., Kiuchi, K., Hagiwara, M., Hidaka, H., Matsumoto, K. und Irie, K. (1997). Functional analyses of mammalian protein kinase C isozymes in budding yeast and mammalian fibroblasts [published erratum appears in *Genes Cells* 1997 Dec;2(12):801]. *Genes Cells* **2**, 601-614.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A. und Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 5931-5938.
- Ogas, J., Andrews, B. J. und Herskowitz, I. (1991). Transcriptional activation of *CLN1*, *CLN2*, and a putative new G1 cyclin (*HCS26*) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* **66**, 1015-1026.
- Ohya, Y., Qadota, H., Anraku, Y., Pringle, J. R. und Botstein, D. (1993). Suppression of yeast geranylgeranyl transferase I defect by alternative prenylation of two target GTPases, Rho1p and Cdc42p. *Mol.Biol.Cell* **4**, 1017-1025.
- Olson, M. F., Sterpetti, P., Nagata, K., Toksoz, D. und Hall, A. (1997). Distinct roles for DH and PH domains in the Lbc oncogene. *Oncogene* **15**, 2827-2831.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y. und Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 2196-2207.
- Page, B. D. und Snyder, M. (1992). CIK1: a developmentally regulated spindle pole body-associated protein important for microtubule functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **6**, 1414-1429.
- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D. J., Carpentier, J. L., Klig, L. S. und Payton, M. A. (1992). The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional *PKC1* gene product. *Mol.Cell.Biol.* **12**, 4896-4905.
- Paravicini, G. und Friedli, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol.Gen.Genet.* **251**, 682-691.
- Paravicini, G., Mendoza, A., Antonsson, B., Cooper, M., Losberger, C. und Payton, M. A. (1996). The *Candida albicans* *PKC1* gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast* **12**, 741-756.
- Park, H. und Lennarz, W. J. (2000). Evidence for interaction of yeast protein kinase C with several subunits of oligosaccharyl transferase. *Glycobiology* **10**, 737-744.
- Parsons, W. J., Ramkumar, V. und Stiles, G. L. (1988). Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, Gi. *Mol.Pharmacol.* **34**, 37-41.
- Pearson, B. M., Hernando, Y. und Schweizer, M. (1998). Construction of PCR-ligated long flanking homology cassettes for use in the functional analysis of six unknown open reading frames from the left and right arms of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XV. *Yeast* **14**, 391-399.
- Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R. und Bender, A. (1994). Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J.Cell.Biol.* **127**, 1395-1406.
- Philips, J. und Herskowitz, I. (1997). Osmotic balance regulates cell fusion during mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell.Biol.* **138**, 961-974.
- Philips, J. und Herskowitz, I. (1998). Identification of Kel1p, a kelch domain-containing protein involved in cell fusion and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell.Biol.* **143**, 375-389.
- Ponting, C. P., Schultz, J., Milpetz, F. und Bork, P. (1999). SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic.Acids.Res.* **27**, 229-232.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. und Vai, M. (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggl1delta* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **179**, 463-469.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. und Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- $\beta$ -glucan synthase [see comments]. *Science* **272**, 279-281.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B. und Levin, D. E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell.Biol.* **19**, 3969-3976.
- Ram, A. F., Brekelmans, S. S., Oehlen, L. J. und Klis, F. M. (1995). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the  $\beta$  1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**, 165-170.
- Ram, A. F., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H., Douwes, J. E., Baginsky, W., Mazur, P., Van Den Ende, H. und Klis, F. M. (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of  $\beta$ -1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J.Bacteriol.* **180**, 1418-1424.

- Ram, A. F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. und Klis, F. M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**, 1019-1030.
- Reed, R. R., Young, R. A., Steitz, J. A., Grindley, N. D. und Guyer, M. S. (1979). Transposition of the *Escherichia coli* insertion element gamma generates a five-base-pair repeat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 4882-4886.
- Rempola, B., Kaniak, A., Migdalski, A., Rytka, J., Slonimski, P. P. und di Rago, J. P. (2000). Functional analysis of *RRD1* (*YIL153w*) and *RRD2* (*YPL152w*), which encode two putative activators of the phosphotyrosyl phosphatase activity of PP2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **262**, 1081-1092.
- Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C. und Friend, S. H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**, 873-880.
- Robzyk, K. und Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic.Acids.Res.* **20**, 3790.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A. und Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J.Cell.Biol.* **127**, 567-579.
- Roemer, T., Vallier, L., Sheu, Y. J. und Snyder, M. (1998). The Spa2-related protein, Sph1p, is important for polarized growth in yeast. *J.Cell.Sci.* **111**, 479-494.
- Roncero, C. und Durán, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: *in vivo* activation of chitin polymerization. *J.Bacteriol.* **163**, 1180-1185.
- Roth, F. P., Hughes, J. D., Estep, P. W. und Church, G. M. (1998). Finding DNA regulatory motifs within unaligned noncoding sequences clustered by whole-genome mRNA quantitation [see comments]. *Nat.Biotechnol.* **16**, 939-945.
- Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202-211.
- Russell, D. W., Jensen, R., Zoller, M. J., Burke, J., Errede, B., Smith, M. und Herskowitz, I. (1986). Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* HO gene and analysis of its upstream regulatory region. *Mol.Cell.Biol.* **6**, 4281-4294.
- Salim, K., Bottomley, M. J., Querfurth, E., Zvelebil, M. J., Gout, I., Scaife, R., Margolis, R. L., Gigg, R., Smith, C. I., Driscoll, P. C., Waterfield, M. D. und Panayotou, G. (1996). Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* **15**, 6241-6250.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). 'Molecular Cloning - A Laboratory Manual.' 2nd Edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.)
- Sánchez-García, I. und Rabbitts, T. H. (1994). The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins. *Trends.Genet.* **10**, 315-320.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J. und Hall, M. N. (1998). The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *EMBO J.* **17**, 6924-6931.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T. und Hall, M. N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* **88**, 531-542.
- Schmidt, A. und Hall, M. N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Ann.Rev.Cell.Develop.Biol.* **14**, 305-338.
- Schmidt, A., Hall, M. N. und Koller, A. (1994). Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *TAT1* and *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 6597-6606.
- Schmitz, H.-P. (1997): Untersuchungen zur Proteinkinase C-vermittelten Signaltransduktion bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit
- Schreuder, M. P., Mooren, A. T., Toschka, H. Y., Verrips, C. T. und Klis, F. M. (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends.Biotechnol.* **14**, 115-120.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P. und Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic.Acids.Res.* **28**, 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 5857-5864.
- Seifert, H. S., Chen, E. Y., So, M. und Heffron, F. (1986). Shuttle mutagenesis: a method of transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 735-739.

- Servos, J., Haase, E. und Brendel, M. (1993). Gene *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Mol.Gen.Genet.* **236**, 214-218.
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Durán, A. und Cabib, E. (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J.Cell.Biol.* **114**, 111-123.
- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C. und Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol.Cell.Biol.* **18**, 4053-4069.
- Shimizu, J., Yoda, K. und Yamasaki, M. (1994). The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae* *hpo2* mutant is due to a mutation in *PKC1*, which regulates expression of  $\beta$ -glucanase. *Mol.Gen.Genet.* **242**, 641-648.
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H. und Klis, F. M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr.Opinion.Microbiol.* **2**, 348-352.
- Snyder, M. (1989). The SPA2 protein of yeast localizes to sites of cell growth. *J.Cell.Biol.* **108**, 1419-1429.
- Soler, M., Plovins, A., Martín, H., Molina, M. und Nombela, C. (1995). Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and *in vivo* interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol.Microbiol.* **17**, 833-842.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503-517.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., Brown, P. O., Botstein, D. und Futcher, B. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol.Biol.Cell* **9**, 3273-3297.
- Sprague, G. F., Jr. (1998). Control of MAP kinase signaling specificity or how not to go HOG wild. *Genes Dev.* **12**, 2817-2820.
- Stateva, L. I., Venkov, P. V., Hadjiolov, A. A., Koleva, L. A. und Lyudskahov, N. L. (1988). Polyploid fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae*-a novel source of proteins for nutritional purposes. *Yeast* **4**, 219-225.
- Stevenson, B. J., Ferguson, B., De Virgilio, C., Bi, E., Pringle, J. R., Ammerer, G. und Sprague, G. F., Jr. (1995). Mutation of *RGAI*, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **9**, 2949-2963.
- Sutton, A., Lin, F. und Arndt, K. T. (1991). The SIT4 protein phosphatase is required in late G1 for progression into S phase. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **56**, 75-81.
- Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. und Kuno, T. (1996). The fission yeast *pmk1<sup>+</sup>* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol.Cell.Biol.* **16**, 6752-6764.
- Toda, T., Shimanuki, M. und Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J.* **12**, 1987-1995.
- Torres, L., Martín, H., García Saez, M. I., Arroyo, J., Molina, M., Sánchez, M. und Nombela, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol.Microbiol.* **5**, 2845-2854.
- Touhara, K., Inglese, J., Pitcher, J. A., Shaw, G. und Lefkowitz, R. J. (1994). Binding of G protein  $\beta\gamma$ -subunits to pleckstrin homology domains. *J.Biol.Chem.* **269**, 10217-10220.
- Uesono, Y., Fujita, A., Toh-e, A. und Kikuchi, Y. (1994). The *MCS1/SSD1/SRK1/SSL1* gene is involved in stable maintenance of the chromosome in yeast. *Gene* **143**, 135-138.
- Uesono, Y., Toh-e-A. und Kikuchi, Y. (1997). Ssd1p of *Saccharomyces cerevisiae* associates with RNA. *J.Biol.Chem.* **272**, 16103-16109.
- Umikawa, M., Tanaka, K., Kamei, T., Shimizu, K., Imamura, H., Sasaki, T. und Takai, Y. (1998). Interaction of Rho1p target Bni1p with F-actin-binding elongation factor 1alpha: implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* **16**, 2011-2016.
- Verna, J. und Ballester, R. (1999). A novel role for the mating type (*MAT*) locus in the maintenance of cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **261**, 681-689.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A. und Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 13804-13809.
- Vieira, J. und Messing, J. (1991). New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* **100**, 189-194.
- Viswanathan, M., Muthukumar, G., Cong, Y.-S. und Lenard, J. (1994). Seripauperins of *Saccharomyces cerevisiae*: a new multigene family encoding serine-poor relatives of serine-rich proteins. *Gene* **148**, 149-153.

- Vollenbroich, V., Meyer, J., Engels, R., Cardinali, G., Menezes, R. A. und Hollenberg, C. P. (1999). Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p. *Mol.Gen.Genet.* **261**, 495-507.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. und Philippsen, P. (1997). Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR- targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1065-1075.
- Wang, H., Lockwood, S. K., Hoeltzel, M. F. und Schiefelbein, J. W. (1997). The ROOT HAIR DEFECTIVE3 gene encodes an evolutionarily conserved protein with GTP-binding motifs and is required for regulated cell enlargement in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **11**, 799-811.
- Wang, T. und Bretscher, A. (1995). The rho-GAP encoded by *BEM2* regulates cytoskeletal structure in budding yeast. *Mol.Biol.Cell.* **6**, 1011-1024.
- Watanabe, M., Chen, C.-Y. und Levin, D. E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae PKC1* encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J.Biol.Chem.* **269**, 16829-16836.
- Watanabe, Y., Irie, K. und Matsumoto, K. (1995). Yeast *RLM1* encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell.Biol.* **15**, 5740-5749.
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K. und Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell.Biol.* **17**, 2615-2623.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. und Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol.Rev.* **79**, 143-180.
- Wilson, R. B., Brenner, A. A., White, T. B., Engler, M. J., Gaughran, J. P. und Tatchell, K. (1991). The *Saccharomyces cerevisiae SRK1* gene, a suppressor of *bcy1* and *ins1*, may be involved in protein phosphatase function. *Mol.Cell.Biol.* **11**, 3369-3373.
- Wixler, V., Geerts, D., Laplantine, E., Westhoff, D., Smyth, N., Aumailley, M., Sonnenberg, A. und Paulsson, M. (2000). The LIM-only protein DRAL/FHL2 binds to the cytoplasmic domain of several  $\alpha$  and  $\beta$  integrin chains and is recruited to adhesion complexes. *J.Biol.Chem.* **275**, 33669-33678.
- Xu, J. R., Staiger, C. J. und Hamer, J. E. (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**, 12713-12718.
- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T. und Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell.Biol.* **125**, 1077-1093.
- Yan, C., Lee, L. H. und Davis, L. I. (1998). Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *EMBO J.* **17**, 7416-7429.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yashar, B., Irie, K., Printen, J. A., Stevenson, B. J., Sprague, G. F., Jr., Matsumoto, K. und Errede, B. (1995). Yeast MEK-dependent signal transduction: response thresholds and parameters affecting fidelity. *Mol.Cell.Biol.* **15**, 6545-6553.
- Yashar, B. M., Kelley, C., Yee, K., Errede, B. und Zon, L. I. (1993). Novel members of the mitogen-activated protein kinase activator family in *Xenopus laevis*. *Mol.Cell.Biol.* **13**, 5738-5748.
- Yoshida, S., Ikeda, E., Uno, I. und Mitsuzawa, H. (1992). Characterization of a staurosporine- and temperature-sensitive mutant, *stt1*, of *Saccharomyces cerevisiae*: *STT1* is allelic to *PKC1*. *Mol.Gen.Genet.* **231**, 337-344.
- Zaborowska, D. und Żuk, J. (1990). The effect of DNA replication on mutation of the *Saccharomyces cerevisiae CDC8* gene. *Curr.Genet.* **17**, 275-280.
- Zarzov, P., Mazzoni, C. und Mann, C. (1996). The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* **15**, 83-91.
- Zenke, F. T., Engels, R., Vollenbroich, V., Meyer, J., Hollenberg, C. P. und Breunig, K. D. (1996). Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p [published erratum appears in *Science* 1996 Jul 26;273(5274):417]. *Science* **272**, 1662-1665.
- Zhang, N. S., Gardner, D. C. J., Oliver, S. G. und Stateva, L. I. (1999). Genetically controlled cell lysis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol.Bioengineer.* **64**, 607-615.
- Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engele, P., Roe, T., Cyert, M. S. und Levin, D. E. (1998). Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol.Cell.Biol.* **18**, 1013-1022.
- Zheng, J., Cahill, S. M., Lemmon, M. A., Fushman, D., Schlessinger, J. und Cowburn, D. (1996). Identification of the binding site for acidic phospholipids on the pH domain of dynamin: implications for stimulation of GTPase activity. *J.Mol.Biol.* **255**, 14-21.

- Zheng, Y., Cerione, R. und Bender, A.** (1994). Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J.Biol.Chem.* **269**, 2369-2372.
- Zheng, Y., Hart, M. J., Shinjo, K., Evans, T., Bender, A. und Cerione, R. A.** (1993). Biochemical comparisons of the *Saccharomyces cerevisiae* Bem2 and Bem3 proteins. Delineation of a limit Cdc42 GTPase-activating protein domain. *J.Biol.Chem.* **268**, 24629-24634.
- Zimmermann, F. K.** (1975). Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat.Res.* **31**, 71-86.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
3-AT	3-Aminotriazol
ATP	Adenosintriphosphat
BCK	"bypass of C kinase"
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] decan} -4-yl) phenylphosphat; Substrat für die alkalische Phosphatase
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DAG	Diacylglycerol
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykolbis (β-aminoethylether) N, N, N',N'-Tetraacetat
ERK	"extracellular signal-regulated kinase"
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GAP	"GTPase-activating protein"
Gal	Galaktose
GDI	"GDP dissociation inhibitor"
GEF	"guanine nucleotide exchange factor"
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HMG	"high mobility group proteins"
<i>HOCI</i>	"homologous to <i>OCHI</i> "
HOG	"high osmolarity glycerol"
HSE	heat-shock element
HSF	heat-shock transcription factor
IP <sub>3</sub>	Inositol-1, 4, 5-trisphosphate
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
<i>K.lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
LIM	lin-11, <i>ISL1</i> ; mec-3
<i>LRG1</i>	LIM-RhoGAP homologous gene product
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MADS	MCM1, agamous, deficiens and serum factor
MAPK	"mitogen-activated protein kinase"= MAP-Kinase
MAPKK	MAP-Kinase-Kinase
MAPKKK	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MEK	MAPK/ERK Kinase
MEKK	MAPK/ERK Kinase Kinase
min	Minute
ml, l, µl	Milliliter, Liter, Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitrotetrazolium Chloridblau
nm	Nanometer (Angabe für Wellenlänge)
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PAA	Polyacrylamid

PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbisphosphat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PH	pleckstrin homology
PKA	Proteinkinase A
Plc	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
<i>RLM1</i>	"resistance to lethality of <i>MKK1</i> <sup>P386</sup> "
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
<sup>35</sup> S	radioaktives Schwefelisotop
SBF	"SCB-binding factor"
<i>S.cerevisiae</i> , <i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLK	"synthetic lethal kinase"
SSK1	"suppressor of sensor kinase"
STE	"sterile"
STRE	"stress response element"
STT	"staurosporine- and temperature-sensitive"
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethylendiamin
TET	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U, mU	Unit, Milliunit (Enzymeinheiten)
UV	ultraviolette Strahlung
W	Watt
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
YEPD	"Yeast extract-Peptone-Dextrose"- (Vollmedium)
YNB	"Yeast nitrogen base"
z.B.	zum Beispiel

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

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Heinisch für die Überlassung des Themas, sowie die Betreuung dieser Arbeit, insbesondere den Freiraum, den er mir zur Bearbeitung des Themas gelassen hat, seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung über den gesamten Zeitraum dieser Arbeit.

Bei Frau Prof. Dr. E. Knust möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe Hans-Peter Schmitz, Stefanie Huppert, Ute Gengenbacher, Jörg Jacoby, Sigrid Nilius, Anja Strauß und Mehmet Saltürk möchte ich mich bedanken für das freundliche Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft.

Frau Anna Nagy möchte ich danken für das ständige Beschaffen von Glaswaren aller Art und ihre unübertroffene Hilfsbereitschaft.

Ruth Engels möchte ich danken für ihren Zuspruch, die unermüdlichen Diskussionen, ihre Freundschaft und jede gute Tasse Tee, die wir zusammen getrunken haben.

Bei Susanne Neuhausen möchte ich mich für die fast 22jährige Freundschaft bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, insbesondere an meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben.

Bei Hans-Peter Schmitz möchte ich mich für seine Unterstützung und seinen Zuspruch bedanken und dafür, daß er immer für mich da war und ist.

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe und keine anderen als die hier angegeben Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, 20.Dezember 2000

---

---

## Lebenslauf

**Name, Vorname :** Lorberg, Anja  
**Anschrift :** Jakob-Lintzen-Straße 39  
47807 Krefeld  
**Geburtsdatum :** 15. März 1972 in Krefeld  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Schulausbildung:** **1978 bis 1982** Besuch der Grundschule Vulkanstraße in Krefeld  
**1982 bis 1991** Besuch des Maria-Sybilla-Merian-Gymnasiums in Krefeld

**Studium:** **Oktober 1991 -  
Dezember 1996** Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit den Schwerpunkten Mikrobiologie, Physikalische Biologie und Physik  
Abschluß mit der Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie mit dem Titel:  
"Untersuchungen zur Glykolyse bei der Hefe *Candida albicans*"

**Januar 1997-  
weiter** Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität zum Thema:  
"Untersuchungen zur Regulation der Zellintegrität in Hefen"

---

---

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung vorgesehen:**

Anja Lorberg, Jörg J. Jacoby, Hans-Peter Schmitz und Jürgen J. Heinisch: Genetic characterization of a new component affecting the Pkc1p-mediated pathway in *S. cerevisiae*. (Poster) **Biol. Chem. 480 Special Supplement: 175 (1999)**

Lutz Kirchrath, Anja Lorberg, Hans-Peter Schmitz, Ute Gengenbacher und Jürgen J. Heinisch: Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **J.Mol.Biol.300: 743-758 (2000)**.

Anja Lorberg, Hans-Peter Schmitz, Jörg J. Jacoby, und Jürgen J. Heinisch: A role for the putative GAP Lrg1p in the protein kinase C-mediated cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. (in Vorbereitung)

**Weitere Publikationen**

Anja Lorberg und Jürgen J. Heinisch: Phosphofruktokinase - ein Schlüsselenzym der Glykolyse?. **BIOSpektrum 5 1997: 43-45**.

Anja Lorberg, Lutz Kirchrath, Joachim F. Ernst und Jürgen J. Heinisch: Genetic and biochemical characterization of phosphofruktokinase from the opportunistic pathogenic yeast *Candida albicans*. **Eur.J.Biochem. 260: 217 - 226 (1999)**

Jürgen J. Heinisch, Anja Lorberg, Hans-Peter Schmitz und Jörg J. Jacoby: The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol.Microbiol.32: 671-80 (1999)**

Hans-Peter Schmitz, Anja Lorberg und Jürgen J. Heinisch: *S. cerevisiae* Pkc1p as a model in regulation of protein kinase activity. (Poster) **Biol. Chem.480 Special Supplement: 193 (1999)**

---

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

Referent: Professor Dr. J.J. Heinisch

Koreferent: Professor Dr. E. Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2001

Elektronische Veröffentlichung unter:

<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2001/lorberg.html>