

Physiologische und genetische Untersuchungen zur Funktion  
regulatorischer Proteindomänen in der Signaltransduktion am  
Beispiel der Proteinkinase C von *Saccharomyces cerevisiae*

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

vorgelegt von  
Hans-Peter Schmitz  
aus Ratingen

Düsseldorf  
2001

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Struktur und Funktion der Proteinkinase C „Super Familie“</b>	<b>2</b>
1.1.1 Die Kinase-Domäne	5
1.1.2 Die Cystein-reiche Domäne	6
1.1.3 Die C2 Domäne	9
1.1.4 Die „Homologie-Region 1“ (HR1)	10
1.1.5 Weitere Regionen und Reste mit funktioneller Bedeutung	11
1.1.5.1 Die V5-Region	11
1.1.5.2 Die Pseudosubstratbindestelle	11
<b>1.2 Proteinkinase C-abhängige Signaltransduktion in Hefe</b>	<b>12</b>
1.2.1 Die Komponenten des <i>PKCI</i> -Signaltransduktionsweges	12
1.2.1.1 Die Proteinkinase C	12
1.2.1.2 Das MAP-Kinase Modul	13
1.2.1.3 Transkriptionsfaktoren	15
1.2.1.4 Aktivatoren des Pkc1p Signaltransduktionsweges	15
1.2.1.5 Aktivitätshemmende Komponenten	19
1.2.2 Einfließende Signale	19
1.2.2 Ausgehende Signale	20
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>22</b>
2.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Enzyme und Antikörper	22
2.1.1.1 Chemikalien	22
2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.1.3 Enzyme	23
2.1.1.4 Verwendete Antikörper	24
2.1.2 Stämme und Medien	24
2.1.2.1 Hefestämme	24
2.1.2.2 <i>E.coli</i> -Stämme	29
2.1.3 Plasmide und Genbanken	30
2.1.3.1 Ausgangsplasmide	30
2.1.3.2 Plasmidkonstruktionen	33
2.1.3.3 Verwendete Transposon-Genbank	36
2.1.4 Verwendete Oligonukleotide	36

---

<b>2.2 Methoden</b>	<b>38</b>
2.2.1 Transformationen	38
2.2.1.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	38
2.2.1.2 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.2.2 Sporulation, Tetraden- und Paarungstypanalyse	38
2.2.3 Wachstumsanalyse mit seriellen Verdünnungsreihen	39
2.2.4 Isolierung Transposon-flankierender Sequenzen	39
2.2.5 Analyse von Nukleinsäuren	39
2.2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
2.2.5.1.2 Plasmid-Isolierung mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kit“	40
2.2.5.1.3 Plasmid-Isolierung durch Qiagen „Midipräparation“	40
2.2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S.cerevisiae</i> (Robzyk und Kassir, 1992)	40
2.2.5.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S.cerevisiae</i>	41
2.2.5.4 Isolierung von Nukleinsäure-Fragmenten aus Agarose-Gelen	41
2.2.5.5 Reinigung von PCR-Fragmenten	41
2.2.5.6 Restriktion von Nukleinsäuren	42
2.2.5.7 Dephosphorylierung von Nukleinsäure-Fragmenten	42
2.2.5.8 DNA-Ligation	42
2.2.5.9 Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten mit Hilfe von Gelelektrophoresen	42
2.2.5.10 Nicht-radioaktive Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin	43
2.2.5.11 Nachweis spezifischer Nukleinsäure-Sequenzen	43
2.2.5.12 Radioaktive Sequenzierung von Plasmid-DNA	44
2.2.5.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA aus Abschnitt 3.4	44
2.2.5.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.5.15 <i>In vitro</i> Mutagenese von DNA Fragmenten	45
2.2.5 Analyse von Proteinen	45
2.2.5.1 Herstellung von <i>S. cerevisiae</i> -Rohextrakten	45
2.2.5.2 Herstellung von <i>E. coli</i> -Rohextrakten	45
2.2.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes	45
2.2.5.4 Nachweis und Bestimmung enzymatischer Aktivität	46
2.2.5.5 Nachweis spezifischer Proteine	48
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Untersuchungen an der „Cystein-reichen“ Domäne</b>	<b>51</b>
3.1.1 Weiterführende Untersuchungen an der C1 C <sub>434, 437</sub> S/C <sub>514,517</sub> S Mutanten	51
3.1.1.1 Dihybrid Untersuchungen mit dem C <sub>434, 437</sub> S/C <sub>514,517</sub> S <i>pkc1</i> Allel	51
3.1.1.3 Einfluß der Pkc1p C <sub>434,437</sub> S/C <sub>514,517</sub> S Mutation auf die Lokalisierung	53
3.1.1.2 Bestimmung der relativen Kinaseaktivität von Pkc1p und Pkc1p C <sub>434, 437</sub> S/C <sub>514,517</sub> S <i>in vitro</i>	55
3.1.1.3 Konstruktion eines Reporterstammes zur indirekten Messung der Aktivität von Pkc1p	57
3.1.2 Weiterführende Untersuchungen an der C1-Domäne	59

---

3.1.2.1 Deletionen in C1	59
3.1.2.2 Untersuchungen von Punktmutationen in den C1A und C1B Wiederholungen der Cystein-reichen Region von Pkc1p	61
3.1.2.3 Insertion der C1 von PKC $\eta$ und Raf in Pkc1p von <i>S. cerevisiae</i>	64
<b>3.2 Untersuchung der aminoterminalen Region von Pkc1p</b>	<b>71</b>
3.2.1 Deletion der HR1 in Pkc1p	71
3.2.2 Zufallsgerichtete Mutagenese der HR1 von Pkc1p mittels Polymerasekettenreaktion	73
3.2.2.1 Prinzip der zufallsgerichteten PCR-Mutagenese	73
3.2.2.1 Phänotypen und Lokalisierung der isolierten Mutationen	74
3.2.3 Untersuchungen an der Pkc1p L <sub>54</sub> S Mutante	75
3.2.3.1 Rekonstruktion der Mutation mittels <i>in vitro</i> -Mutagenese	75
3.2.3.1 Phänotypen der Mutanten	76
3.2.3.2 Phosphorylierung der MAP-Kinase Mpk1p in Pkc1p L <sub>54</sub> S-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp	77
3.2.3.2 Interaktionen mit HR1 von Pkc1p	77
3.2.3.3 Expression und Aufreinigung eines HR1-Peptides aus <i>E. coli</i>	80
3.2.3.4 Expression und Aufreinigung von Rho1p aus <i>E. coli</i>	81
<b>3.3 Kombination von C1- und HR1-Mutanten</b>	<b>83</b>
<b>3.4 Entwicklung eines Ansatzes zur Identifikation von Genen mit negativer regulatorischer Wirkung auf den Pkc1p-Signaltransduktionsweg</b>	<b>83</b>
3.4.1 Prinzip des Ansatzes	84
3.4.2 Genomische Lokalisierung der isolierten Mutanten	87
3.4.2.1 Die Mutante tn 1	87
3.4.2.2 Die Mutante tn 2	87
3.4.2.3 Die Mutante tn 4	89
3.4.2.4 Die Mutante tn 5	89
3.4.2.5 Die Mutante tn 6	90
3.4.2.6 Die Mutante tn 7	91
3.4.2.7 Die Mutante tn 8	91
3.4.2.8 Die Mutante tn 9	92
3.4.2.9 Die Mutante tn 10	93
3.4.2.10 Die Mutante tn 12	93
3.4.2.11 Die Mutante tn 13	94
3.4.2.12 Die Mutante tn 14	95
3.4.2.13 Die Mutante tn 15	95
3.4.2.14 Die Mutante tn 16	95
3.4.2.15 Die Mutante tn 17	96
3.4.2.16 Die Mutante tn 18	96
3.4.2.17 Die Mutante tn 19	96
3.4.2.18 Die Mutante tn 23	97
3.4.2.19 Die Mutante tn 24	98
3.4.2.20 Die Mutante tn 27	99
3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.4.2	100

---

---

<b>4. Diskussion</b>	<b>101</b>
<b>4.1 Die Regulation von Pkc1p an der C1-Domäne</b>	<b>102</b>
4.1.1 An der Regulation von Pkc1p an der C1-Domäne ist Rho1p beteiligt	102
4.1.2 Unterschiede in der Regulation von Pkc1p an C1A und C1B	103
4.1.3 Aminosäurereste in C1B sind verantwortlich für den Kontakt zwischen Rho1p und der C1-Domäne	107
4.1.4 Austauschmutanten der C1 Domäne geben keine Hinweise auf eine Aktivierbarkeit von Pkc1p durch DAG	108
<b>4.2 Die regulatorische Funktion des aminoterminalen Bereiches von Pkc1p</b>	<b>110</b>
4.2.1 Die beobachteten Phänotypen der HR1-Mutanten sind möglicherweise unabhängig vom MAP-Kinase-Modul	111
4.2.2 Die HR1-Domäne von Pkc1p interagiert mit Rho1p	111
<b>4.3 Die Kombination von Mutationen in C1 und HR1 ist letal</b>	<b>113</b>
<b>4.4 Modell der Aktivierung von Pkc1p</b>	<b>114</b>
<b>4.5 Identifikation weiterer an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität beteiligter Gene</b>	<b>117</b>
4.5.1 Gene mit mitochondrialer Funktion	117
4.5.2 Gene mit Funktion in der Zellwand	118
4.5.3 Gene mit Funktion in der Regulation des Ionenhaushalts	118
4.5.4 Gene mit Funktion im Vesikeltransport	119
4.5.5 Ein Gen mit einer Funktion im Inositolphosphatstoffwechsel	119
4.5.6 Gene mit unbekannter Funktion	120
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>121</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>122</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>131</b>

---

# 1. Einleitung

Obwohl Zellen durch die sie umgebende Membran, und pflanzliche Zellen, Pilzzellen sowie viele niedere Einzeller zusätzlich durch eine Zellwand gegenüber dem sie umgebenden Medium isoliert und vor Umwelteinflüssen geschützt sind, können sie ihr Überleben nur sicherstellen, indem sie ihren Stoffwechsel ständig an Änderungen in ihrer Umgebung anpassen. Zu den Faktoren, die solche Änderungen herbeiführen gehören z.B. Nährstoffe, Osmolarität, Temperatur, mechanische Einflüsse und Moleküle, die der Kommunikation unter den Zellen dienen. Dieser Vorgang, bei dem Änderungen außerhalb der Zelle detektiert werden und die zellintern zu einer Änderung des Transkriptionsprofils (Roberts *et al.*, 2000) und damit letztlich der enzymatischen Ausstattung der Zelle führt, wird allgemein als Signaltransduktion bezeichnet. Die Bedeutung der Signaltransduktion für die Funktion einer Zelle bzw. eines Organismus wird dadurch deutlich, daß bei vielen Krankheiten eine Störung der Signaltransduktion vorliegt. So ist z.B. bei colorektalem Krebs häufig der „Wnt-Signaltransduktionsweg“ gestört (Bienz und Clevers, 2000) und vererbte Defekte in Proteinen anderer Signaltransduktionswege führen neben der Krebsentstehung zu so unterschiedlichen Krankheitsbildern, wie Chondrodysplasie (Störung der Knorpelbildung), Synostose (Verwachsung benachbarter Knochen), dem persistierenden Müllerschen Duct Syndrom (Bestehenbleiben der weiblichen Geschlechtsanlagen beim Mann), dem Rendu-Osler-Weber Syndrom (äußert sich durch Blutungen im Gastro-Intestinal Trakt), dem juvenilen Polyposis Syndrom (Dickdarmpolypen) und Holoprosencephalie (HPE, Fehler bei der Aufteilung der Hirnhälften; alle beschrieben in Massague *et al.*, 2000). Für die als „Proteinkinase C Superfamilie“ (Mellor und Parker, 1998) bezeichnete Enzymklasse wurde insbesondere eine allgemeine Beteiligung an der Tumorentwicklung (Kikkawa *et al.*, 1983), dem Unterdrücken des programmierten Zelltodes in Brustkrebszellen (Akkaraju und Basu, 2000) und dem Ausbilden vaskulärer Komplikationen bei Diabetes mellitus (Ishii *et al.*, 1998) beschrieben. Diese Beteiligung an der Ausprägung verschiedenster Krankheitsbilder ist der Grund für intensive Bemühungen zur Aufklärung des Aktivierungsmechanismus dieser Proteine. Im Folgenden soll zunächst kurz der aktuelle Stand dieser Bemühungen wiedergegeben werden.

## 1.1 Struktur und Funktion der Proteinkinase C „Super Familie“

Die Proteinkinase C wurde zuerst von Takai *et al.* (1977) identifiziert. Schon bald entdeckte man, daß diese Enzyme durch Phosphatidylserin, calcium-abhängig durch Diacylglycerin und durch tumorfördernde Phorbolster aktiviert werden können (Nishizuka, 1984). Sowohl durch chromatographische Aufreinigung (Huang *et al.*, 1986) als auch durch die Klonierung der Gene mit Hilfe einer c-DNA Genbank aus dem Hirn (Parker *et al.*, 1986; Coussens *et al.*, 1986) wurde schnell klar, daß es sich bei der identifizierten Enzymaktivität um mehrere Isoenzyme handelte, die man als Proteinkinase C  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnete. Mittlerweile teilt man die PKC-Familie in mehrere Untergruppen, basierend auf der Struktur und ihrer Aktivierbarkeit ein (Ron und Kazanietz, 1999). Die erste Gruppe der konventionellen oder klassischen PKC's (cPKC's) umfaßt die zuerst entdeckten PKC's  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II (alternativ gespaltene Varianten) und  $\gamma$ . Diese Gruppe wird aktiviert durch die Bindung von Calciumionen und/oder Diacylglycerin und Phorbolster. Die zweite Gruppe umfaßt die sogenannte Gruppe der neuen PKC's (nPKC's) mit den Mitgliedern  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  und  $\eta$ . Diese Gruppe kann auch durch Diacylglycerin und Phorbolster aktiviert werden. Im Gegensatz zu der Gruppe der klassischen PKC's reagieren diese Enzyme jedoch nicht mit einer Aktivitätserhöhung auf die Gegenwart von Calciumionen. Die dritte Gruppe wird auch als atypisch bezeichnet (aPKC's). Sie umfaßt die Proteinkinase C-Typen  $\xi$  und  $\iota$  (in der Maus  $\lambda$ ). Die Enzyme dieser Gruppe sind weder durch Calciumionen noch durch Diacylglycerin oder Phorbolster aktivierbar. Wie diese Klasse genau aktiviert wird, war bis vor kurzem nicht bekannt. Es mehren sich jedoch Hinweise darauf, daß diese Aktivierung möglicherweise durch die Bindung der kleinen GTPase Cdc42 erfolgt (Coghlan *et al.*, 2000). Zusätzlich zu diesen Mitgliedern der PKC Familie, die auch strukturell eine hohe Homologie besitzen, gibt es noch weitere Enzyme, die im katalytischen Bereich eine große Ähnlichkeit zeigen, deren Struktur in der N-terminalen, regulatorischen Region jedoch stark von den oben erwähnten Gruppen der Proteinkinase C-Familien abweicht. Dazu gehören die Proteinkinase C verwandten Enzyme (PRK's; Palmer *et al.*, 1994, Watanabe *et al.*, 1996). Einige Autoren (Ron und Kazanietz, 1999) rechnen auch die PKC  $\mu$  (bzw. PKD in der Maus) (Johannes *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1994) dazu, während andere Autoren (Mellor und Parker, 1998) sie wegen ihrer abweichenden Substratspezifität und Sensitivität gegenüber Hemmstoffen eher in die Klasse der CaMKII (Calmodulin-abhängige Kinasen Typ II) ähnlichen Proteine einordnen.

Die oben geschilderte Vielfalt an Isoenzymen in der Proteinkinase C „Superfamilie“ ist der Grund dafür, warum bislang kaum zelluläre Funktionen einem einzelnen Enzym zugeschrieben werden konnten. Durch die mangelnde Möglichkeit zur Differenzierung zwischen der Aktivität der einzelnen Enzyme wird häufig von einem Anstieg oder Rückgang der PKC-Aktivität gesprochen. Gemeint ist hiermit die Summe der Aktivitäten aller PKC-Isoenzyme einer Zelle. Die Bemühungen, die Funktionen der einzelnen Isoenzyme besser zu verstehen, führten dazu, daß man auf sogenannte Modellorganismen auswich. Diese bieten häufig den Vorteil, leichter für molekularbiologische Methoden zugänglich zu sein und besitzen oft auch deutlich weniger Isoenzyme des Proteinkinase C-Typen. In Tabelle 1.1 ist die Anzahl der Proteine in verschiedenen Organismen mit einer Domänenstruktur, die ähnlich der Proteinkinase C „Superfamilie“ ist, aufgeführt. Proteinkinasen dieser Klasse wurden bislang nur in eukaryontischen Zellen nachgewiesen. Mit Zunahme der Komplexität eines Organismus kommt es auch zu einer deutlichen Zunahme in der Anzahl der Proteinkinase C-Isoenzyme.

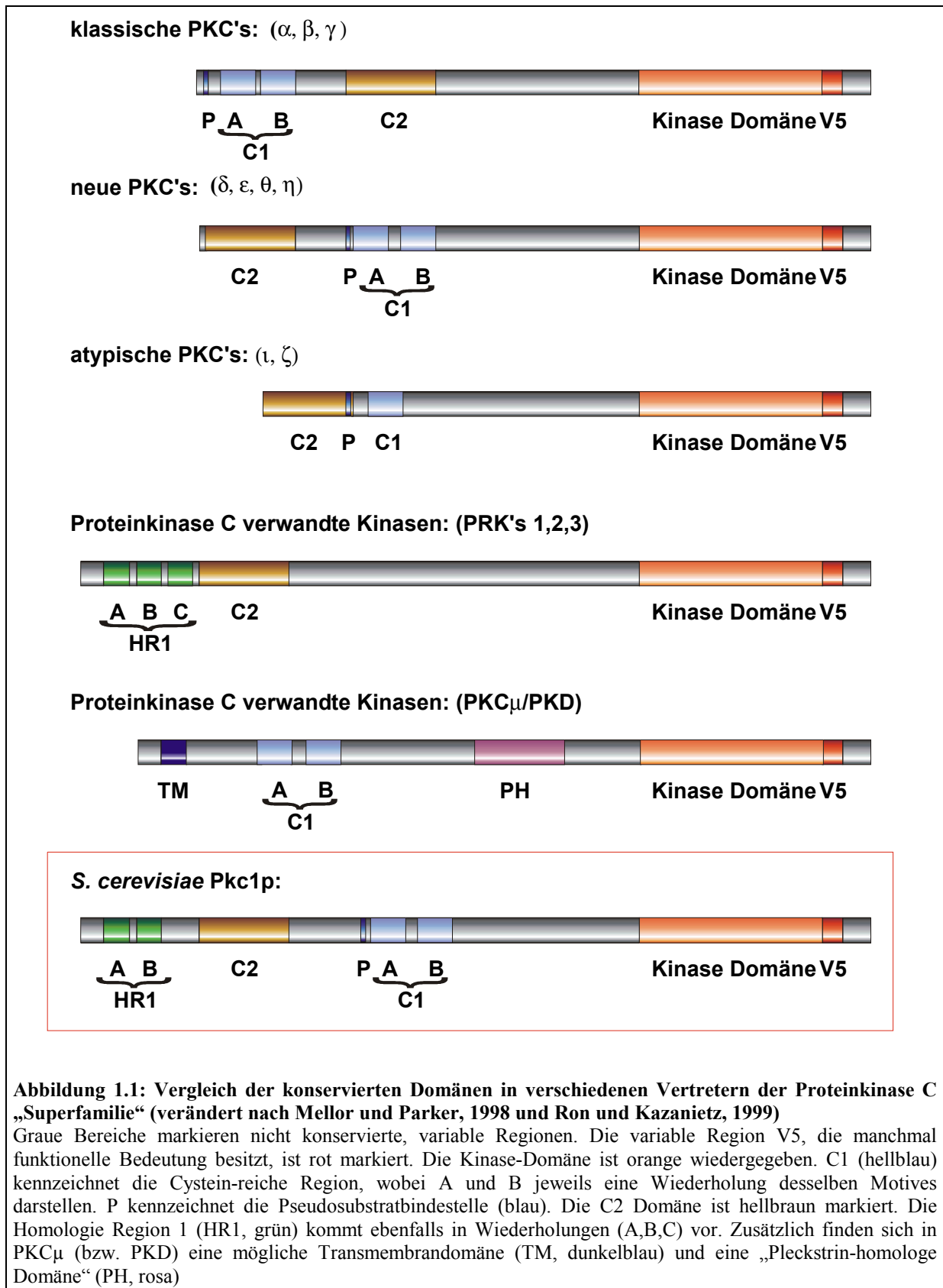
Organismus	Anzahl Proteine
<i>Homo sapiens</i>	22
<i>Mus musculus</i>	17
<i>Caenorhabditis elegans</i>	15
<i>Drosophila melanogaster</i>	12
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1

**Tabelle 1.1: Anzahl von Proteinen mit einer PKC-typischen Domänenstruktur in verschiedenen Spezies**  
 Aufgeführt ist die jeweilige Anzahl von Proteinen mit einer Domänenstruktur, die entweder eine C1- oder eine HR1-Domäne und zusätzlich eine Serin/Threonin Proteinkinase-Domäne besitzen. Die Daten wurden mit Hilfe der SMART Datenbank (Schultz *et al.*, 1998) ermittelt und leiten sich aus den kodierenden DNA-Sequenzen ab.

Man sieht, daß in der Bier- oder Bäckerhefe, wie man spätestens seit der Fertigstellung der Genomsequenz 1996 (Goffeau *et al.*, 1996) weiß, lediglich ein Proteinkinase C-Homologes existiert. Somit erscheint dieser Organismus gut geeignet für Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Proteins. Hinzu kommt, daß Genetik und Anzucht dieses Einzellers gut etabliert sind. Zudem liegen dadurch, daß *Saccharomyces cerevisiae* der erste Eukaryont war, dessen Genomsequenz vollständig verfügbar war, zahlreiche genomweite Untersuchungen der transkriptionellen Regulation vor (DeRisi *et al.*, 1997, Wyrick *et al.*, 1999, Roth *et al.*, 1998, Chu *et al.*, 1998, Spellman *et al.*, 1998, Roberts *et al.*, 2000). Diese Vorteile führten dazu, daß die Proteinkinase C aus *S. cerevisiae* für diese Arbeit als Modellsystem zur Untersuchung der



Struktur und Funktion der Proteinkinase C „Superfamilie“ gewählt wurde. Abbildung 1.1 fasst die auf Sequenzhomologien beruhende Domänenstruktur verschiedener Mitglieder der Proteinkinase C „Superfamilie“ zusammen und stellt sie der von Pkc1p aus *S. cerevisiae* gegenüber.



Abgesehen von der, in seiner Domänenstruktur und Substratspezifität stark abweichenden PKC  $\mu$ , vereinigt Pkc1p alle Domänen, die in den anderen Mitgliedern der Enzymfamilie vorkommen, in einem Protein. Dies, zusammen mit der Tatsache, daß Pkc1p das einzige PKC-Homologe in *S. cerevisiae* ist, führte dazu, daß einige Autoren Hefe Pkc1p als Urahn der gesamten Familie ansehen (Mellor und Parker, 1998). In den nun folgenden Abschnitten soll kurz auf die bisher bekannten Fakten zu den einzelnen Domänen eingegangen werden

### 1.1.1 Die Kinase-Domäne

Die Enzymfamilie der Proteinkinase C gehört zu den sogenannten Serin/Threonin-Kinasen. Sie besitzen wie alle eukaryontischen Proteinkinasen ein ähnlich gefaltetes katalytisches Zentrum (Johnson *et al.*, 1998) und werden in die Familie der „AGC Kinasen“ eingeordnet (Parekh *et al.*, 2000). Die Kinase-Domäne wird noch einmal unterteilt in eine Subdomäne, die verantwortlich für die Bindung von ATP ist, welches den Phosphatrest für die Phosphotransferase-Aktivität bereitstellt und eine Subdomäne, die für die Proteinbindung verantwortlich ist (Ron und Kazanietz, 1999). Letztere bindet im inaktiven Zustand an die Pseudosubstratbindestelle und verhindert die Bindung des Proteinsubstrates (Ron und Kazanietz, 1999). Für die Substratspezifität von PKC Enzymen, mit Ausnahme von PKC $\mu$ , sind die Reste an Position -3 und +2 vom phosphorylierten Serin-Rest von Bedeutung. Die höchste Spezifität zeigen die Enzyme in der Regel bei Peptiden, welche an diesen Positionen Reste besitzen, die mit den entsprechenden Resten der jeweiligen Pseudosubstratbindestelle identisch sind (Nishikawa *et al.*, 1997). Für Pkc1p aus *S. cerevisiae* sind dies z.B. Glycinreste. Desweiteren findet sich in der Kinasedomäne der sogenannte Aktivierungsbogen, der einen Threonin-rest enthält, dessen Phosphorylierung für eine Aktivität des Enzyms essentiell ist (Le Good *et al.*, 1998, Chou *et al.*, 1998). Für diese Phosphorylierung ist in Säugerzellen die Proteinkinase PDK1 („3-phosphoinositide-dependent kinase“) verantwortlich, zu der auch in *S. cerevisiae* ein homologes Protein (Pkh2p) existiert, das dieselbe Funktion erfüllt (Inagaki *et al.*, 1999).

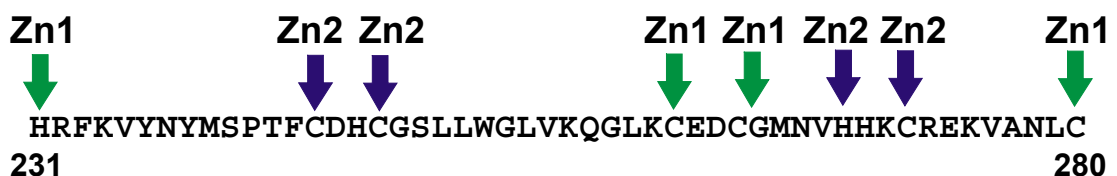
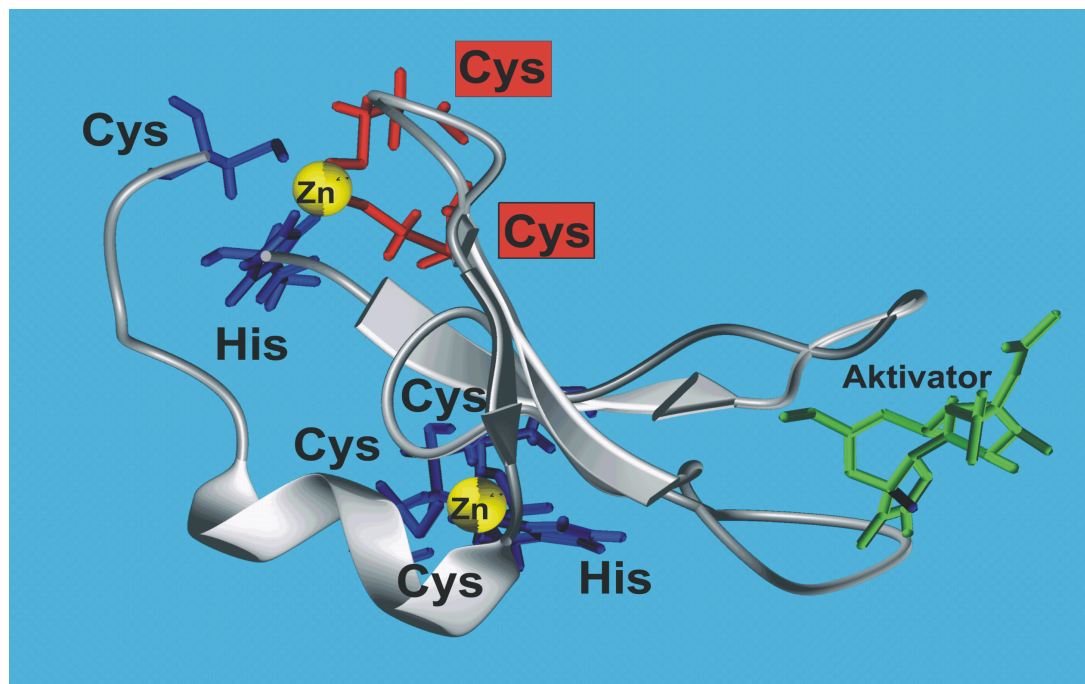
## 1.1.2 Die Cystein-reiche Domäne

Die Cystein-reiche Domäne (C1) ist die Region in den PKC-Enzymen, die für die Bindung der sogenannten Phorbol ester verantwortlich ist. Als solche wurde sie zuerst in den klassischen Proteinkinase C-Enzymen identifiziert (Kikkawa *et al.*, 1989; Bell und Burns, 1991). Die Definition einer C1 Domäne umfaßt zwei Wiederholungen eines Cystein-reichen Motives mit zusammen ca. 120 Aminosäureresten. Das zugehörige Muster in IUPAC Nomenklatur ist:

H-x-[LIVMFYW]-x(8,11)-C-x(2)-C-x(3)-[LIVMFC]-x(5,10)-C-x(2)-C-x(4)-[HD]-x(2)-C-x(5,9)-C (Hofmann *et al.*, 1999)

Wie man in Abbildung 1.1 sieht, enthalten die meisten Proteinkinasen C zwei Wiederholungen dieses Motives. Die erste (aminoternale) Wiederholung wird dabei als C1A die zweite als C1B bezeichnet (Hurley *et al.*, 1997). Eine Ausnahme bilden die atypischen Proteinkinasen C, die nur eine C1-Sequenz aufweisen. Die Analyse weiterer Proteine auf das Vorkommen von Cystein-reichen Domänen ergab, daß neben den atypischen Proteinkinasen noch weitere Enzyme nur einzelne Wiederholungen des C1 Motives besitzen. Hierzu gehören bei Säugerzellen n-Chimaerin, unc13, die Raf- und KSR-Kinasen und eine Reihe von Onkoproteinen, unter anderem Vav und Lfc (Hurley *et al.*, 1997). Verschiedene Strukturanalysen einzelner C1-Domäne wurden veröffentlicht in Form einer Kristallstrukturanalyse, für die klassische PKC  $\delta$  (Zhang *et al.*, 1995) und als NMR-Analysen für die neue PKC  $\alpha$  (Ichikawa *et al.*, 1995) und für die Raf Kinase (Mott *et al.*, 1996). Trotz geringer Unterschiede in den Strukturen werden alle bezüglich ihrer Faltung nach CATH in die homologe Superfamilie 2.20.34.11 eingeordnet (Orengo *et al.*, 1997). Die Struktur der C1-Domäne nach Zhang *et al.* (1995) ist in Abbildung 1.2 dargestellt. Im wesentlichen wird die Struktur der Cystein-reichen Domäne von zwei kleinen  $\beta$ -Faltblattstrukturen und einer kurzen C-terminalen Helix gebildet. Die Bindung des Aktivators (in diesem Fall eines Phorbol esters) erfolgt an den Resten 239-242 und 251-254 (Zhang *et al.*, 1995) in einer aus zwei Faltblattstrukturen gebildeten Furche. Die Reste im Inneren dieser Furche besitzen überwiegend polaren Charakter. Durch Bindung des Aktivators werden sie abgeschirmt und die gesamte Oberfläche des Proteins im Bereich der C1-Domäne wird hydrophob. Dadurch kann sich das PKC-Enzym an die Membran anlagern bzw. bis zu einem gewissen Grad in die Membran eintauchen. Es kommt also nicht, wie bei vielen anderen Proteinen, durch die Bindung des Aktivators zu einer Konformationsänderung. Die Reste, die mit dem Aktivator

interagieren, machen auch den größten Teil des Unterschieds zwischen C1 aus der Raf-Kinase und der aus PKC  $\delta$  aus. Einer der beiden Faltblattbögen, die den Aktivator binden, ist in der C1 der Raf-Kinase verkürzt und somit nicht mehr in der Lage, DAG (Diacylglycerin) oder Phorbolster zu binden (Mott *et al.*, 1996). Nutzt man diese Erkenntnisse, so lassen sich, auf Grund von Sequenzvergleichen, auch die C1-Domänen anderer Proteine in DAG-bindende und nicht DAG-bindende einteilen:



**Abbildung 1.2: Struktur einer C1-Domäne aus PKC $\delta$**

Die Abbildung zeigt ein Bändermodell einer Wiederholung eines C1-Motives aus PKC  $\delta$  (verändert nach einer Abbildung aus Jacoby *et al.* (1997), die auf den Daten von Zhang *et al.* (1995) beruht). Im unteren Teil der Abbildung sieht man die Aminosäuresequenz in IUPAC Ein-Buchstaben-Code. Reste, die jeweils durch einen grünen bzw. blauen Pfeil markiert sind, binden jeweils ein Zinkion und sind im oberen Teil der Abbildung als Stabmodell hervorgehoben. Die rot markierten Aminosäuren wurden in der Arbeit von Jacoby *et al.* (1997) gegen Serinreste ausgetauscht.

Die Konsensussequenzen der beiden Gruppen unterscheiden sich im Wesentlichen in einem Prolin-, zwei Glycin- und einem Glutamin-Rest, die in den DAG-bindenden Domänen im Gegensatz zu den nicht DAG-bindenden konserviert sind (Hurley *et al.*, 1997). Zu letzter Gruppe gehört neben den atypischen Proteinkinasen C  $\iota$  und  $\zeta$  und der Raf Kinase auch das Pkc1p aus *S. cerevisiae*. Tatsächlich konnten Kamada *et al.* (1996) und Jöckel (1999) für ein Fragment des Hefezyms auf dem die C1-Domäne liegt, eine Bindung an die GTPase Rho1p

nachweisen, die ähnlich der Bindung von Ras an die C1-Domäne von Raf-Kinase ist. Beide Klassen von C1-Domänen sind im übrigen neben der Bindung ihrer jeweiligen Aktivatoren zu der Bindung von Phosphatidylserin fähig. Diese kann gleichzeitig zur Bindung des Aktivators erfolgen (Mott *et al.*, 1996). Da Phosphatidylserin ein Bestandteil der Membran ist, ist die aktive Form der bekannten Kinasen, die C1-Domänen enthalten, meist membranassoziiert (Mott *et al.*, 1996). Bislang ist nicht verstanden, aus welchem Grund manche Enzyme nur eine C1-Domäne, andere jedoch zwei Wiederholungen der C1-Domäne besitzen. Hurley *et al.* (1997) schließen allein aus dem Vorhandensein einzelner Wiederholungen des Motives darauf, daß das singuläre Auftreten die ursprüngliche Form der Domäne ist. Dies widerspricht jedoch der Aussage von Mellor und Parker (1998), welche die Proteinkinase C aus Hefe für eine ursprüngliche Form halten, denn diese besitzt eine C1A und eine C1B.

Auch über die Stöchiometrie von Aktivator zu Enzym besteht keine Klarheit. Können zwei Wiederholungen des C1-Motives auch zwei Moleküle des Aktivators binden? Während einige Autoren diese Frage verneinen (Konig *et al.*, 1985; Hannun *et al.*, 1985), kommen andere Autoren zu einem entgegengesetzten Schluß (Burns und Bell, 1991; Kazanietz *et al.*, 1995; Ono *et al.*, 1989). Neuere Hypothesen legen allerdings nahe, daß die beiden Wiederholungen die Aktivatoren mit unterschiedlicher Affinität binden und so eine Feinregulation der Aktivität ermöglichen (Ron und Kazanietz, 1999). Hinweise auf Unterschiede in der Regulation von C1A und C1B ergaben sich erstmals in Arbeiten bei denen eine Bindung von Retinoiden (Vitamin A-Derivate) an C1 Domänen gezeigt wurde (Hoyos *et al.*, 2000). Diese Bindung erfolgte sowohl an der C1 der Raf-Kinase als auch an einigen PKC-Isoenzymen aus unterschiedlichen Organismen, wie Mensch, *Drosophila melanogaster* und Hefe. Bei einigen der Enzyme (humane PKC  $\alpha$ , *Drosophila*-PKC und Hefe-Pkc1p) bindet jedoch nur jeweils eine der Wiederholungen Retinoide. Neben der Bindung konnten die Autoren auch eine mit der Bindung einhergehende indirekte Aktivierung der Kinaseaktivität für PKC  $\alpha$  zeigen, die auch für die anderen Enzyme vermutet wird. Somit stellen Retinoide neben Diacylglycerol, den analogen Phorbolen und einigen GTPasen, einen vierten Faktor dar, der in der Lage ist an der C1-Domäne eine Aktivierung herbeizuführen (Imam *et al.*, 2000). Als biologische Bedeutung wird eine Funktion bei der Aktivierung von PKC und Raf bei oxidativem Stress angenommen (Hoyos *et al.*, 2000).

In aktuellen Modellen zur Aktivierung von PKC-Enzymen ist die Bindung eines Liganden an der C1-Domäne immer der erste und somit ein besonders wichtiger Schritt (Parekh *et al.*, 2000), dessen genauer Ablauf immer noch nicht vollständig verstanden ist.

### 1.1.3 Die C2 Domäne

Wie schon die C1-Domäne findet sich auch die C2-Domäne in zahlreichen Proteinen, die nicht zur PKC-Familie zählen. Dazu gehören Proteine, die an der Entstehung von Lipidmolekülen in der Signaltransduktion beteiligt sind (Clark *et al.*, 1991; Rhee *et al.*, 1989; Hiles *et al.*, 1992), Proteinkinasen (Coussens *et al.*, 1986; Knopf *et al.*, 1986), Proteine, die an der Aktivierung von GTPasen beteiligt sind (Trahey *et al.*, 1988), Proteine, die an der Ubiquitinligation beteiligt sind (Plant *et al.*, 1997) und die Proteinfamilie der Synaptotagmine (beteiligt an der Sekretion an der Synapse; Perin *et al.*, 1990).

Die erste beschriebene Funktion für C2-Domänen war die Aktivitätssteigerung bei klassischen Proteinkinase C-Isoenzymen durch die Bindung von Calciumionen (Nishizuka, 1988). Mittlerweile weiß man, daß es sich hierbei um eine Calciumionen-vermittelte Bindung an Phospholipide handelt (Shao *et al.*, 1996). Die Röntgenstrukturanalyse der C2A-Domäne aus Synaptotagmin I (Sutton *et al.*, 1995) zeigte, daß die Domäne aus zwei Stapeln mit je vier  $\beta$ -Faltblattstrukturen besteht, die durch drei Bögen an der oberen und vier an der unteren Seite der Domäne miteinander verbunden sind. Die koordinierte Bindung von drei Calciumionen erfolgt durch einige Aspartat-, Asparagin- und Serin-Reste. Diese sind auch in C2-Domänen anderer Proteine, die Calciumionen binden können konserviert, fehlen jedoch in Enzymen, die dazu nicht in der Lage sind. Dazu gehört unter anderem auch *S. cerevisiae* Pkc1p (Mellor und Parker, 1998).

Wie schon bei der C1-Domäne führt auch bei der C2-Domäne die Bindung eines Liganden nicht zu einer nennenswerten Konformationsänderung. Vielmehr wird angenommen, daß ein elektrostatischer Effekt, der durch die gebundenen Calciumionen hervorgerufen wird, die Fähigkeit zur Bindung von Phospholipiden vermittelt (Rizo und Sudhof, 1998). Für die C2-Domänen, die nicht in der Lage sind Calciumionen zu binden, wird in erster Linie die Bindung von Proteinen angenommen (Mellor und Parker, 1998). So wurde für die C2 Domäne sowohl von klassischen als auch von neuen Proteinkinasen C gezeigt, daß sie sogenannte RACK's binden (Rezeptor Aktivierter C Kinasen; Mochly-Rosen, 1995; Yedovitzky *et al.*, 1997). Ein Modell für eine mögliche Funktion von Protein-Protein-Interaktionen an der C2-Domäne besteht in der spezifischen Lokalisierung verschiedener PKC-Subspezies in verschiedenen Kompartimenten der Zelle (Mellor und Parker, 1998). Auch wenn bereits ein RACK mit Spezifität für bestimmte PKC-Isotypen nachgewiesen wurde (Csukai *et al.*, 1997), sind für die meisten anderen Isotypen keine solche Proteine beschrieben.

### 1.1.4 Die „Homologie-Region 1“ (HR1)

Die mit Homologie-Region 1 oder als HR1 bezeichnete Domäne ist die jüngste bekannte Domäne in Enzymen der Proteinkinase C „Superfamilie“. Ursprünglich wurde sie als homologer Bereich in den Proteinkinasen PRK1 und PRK2 identifiziert (Palmer *et al.*, 1995), der aus drei Wiederholungen eines ca. 55 Aminosäuren langen Motives besteht. Einzelne Wiederholungen des Motives finden sich auch in den RhoA bindenden Proteinen Rhophilin (Watanabe *et al.*, 1996) und Rhotekin (Reid *et al.*, 1996). Je zwei Wiederholungen des HR1-Motives besitzen die Proteinkinase C-Homologen der Einzeller *S. cerevisiae* (Mellor und Parker, 1998) und *Schizosaccharomyces pombe* (Arellano *et al.*, 1999; Sayers *et al.*, 2000). Aus diesem Grund bezeichnet man, wie schon bei der Cystein-reichen Domäne, die einzelnen Wiederholungen des HR1 Motives in einem Protein mit A, B bzw. C, von aminoterminal nach carboxyterminal (Mellor und Parker, 1998).

Die Funktion des HR1-Motives scheint in erster Linie in der Bindung von kleinen GTPasen zu bestehen (Bishop und Hall, 2000). So konnte für PRK1 eine Interaktion mit RhoA nachgewiesen werden (Flynn *et al.*, 1998). Zusätzlich kann PRK1 durch RhoB an Endosomen dirigiert werden (Mellor *et al.*, 1998). Die Bindung von RhoA an HR1A von PRK1 ist dabei vom GTP-gebundenen Zustand der GTPase abhängig, während die Bindung an HR1B GTP-unabhängig ist und für HR1C keine Bindung gezeigt werden konnte (Flynn *et al.*, 1998). Für *S. pombe* Pck1 und Pck2 wurde eine Interaktion mit Rho1 bzw. Rho2 nachgewiesen (Arellano *et al.*, 1999; Sayers *et al.*, 2000). Bislang konnte eine solche Interaktion für Pck1p aus *S. cerevisiae* nicht gezeigt werden. Stattdessen wurde hier nachgewiesen, daß eine Region der C1-Domäne mit der kleinen GTPase Rho1p interagiert (Nonaka *et al.*, 1995).

Die Röntgenstrukturanalyse der HR1A von PRK1 im Komplex mit RhoA (Maesaki *et al.*, 1999, siehe Abbildung 4.2) ergibt für die Domäne eine sogenannte „ACC-Finger-Struktur“ (für „Antiparallel Coiled Coil“). Sie wird gebildet von einer kurzen aminoterminalen  $\alpha$  Helix, auf die zwei lange  $\alpha$ -Helices folgen. Diese beiden langen Helices stehen über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander in Kontakt, wodurch die Struktur stabilisiert wird. Auf jeder Seite des Fingers findet sich eine Wiederholung übereinander liegender Leucinreste, die für die Bindung von RhoA wichtig sind. Die Struktur der HR1 unterscheidet sich damit wesentlich von den Strukturen anderer Rho-Protein bindender Effektoren, wie dem WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein; Abdul-Manan *et al.*, 1999), den ACK-Tyrosin-Kinasen (Mott *et al.*, 1999) und der c-Raf1 (Nassar *et al.*, 1995; Emerson *et al.*, 1995). Auch die Reste in der GTPase, mit denen die HR1-Domäne interagiert sind verschieden von den Resten mit denen andere Effektoren Kontakt haben (Maesaki *et al.*, 1999).

## 1.1.5 Weitere Regionen und Reste mit funktioneller Bedeutung

### 1.1.5.1 Die V5-Region

Die V5-Region ist ein kurzer Bereich nah am carboxyterminalen Ende von PKC-homologen Enzymen (Mellor und Parker, 1998). Diese Region kürzer als 50 Aminosäuren und wird deshalb im allgemeinen nicht als Domäne bezeichnet. Trotzdem wurden für diese Region bislang zwei verschiedene Funktionen nachgewiesen. Von der klassischen Proteinkinase PKC  $\beta$  existieren zwei Varianten ( $\beta$ I und  $\beta$ II), die durch alternatives Spleißen gebildet werden und die sich in der V5 Region unterscheiden (Mellor und Parker, 1998). Während die  $\beta$ I-Form an den Mikrotubuli lokalisiert ist, findet sich die  $\beta$ II-Form an sekretorischen Vesikeln (Kiley und Parker, 1995). Vermutlich ist diese unterschiedliche Lokalisierung auf eine Protein-Protein-Wechselwirkung zurückzuführen. Die zweite für die V5-Region nachgewiesene Funktion ist die Regulation der Enzymaktivität durch Phosphorylierung. Für mehrere klassische und neue Proteinkinasen C wurde ein Rückgang der Aktivität bei Mutation eines phosphorylierten Restes nachgewiesen (Parekh *et al.*, 2000). Diese Phosphorylierungsstelle fehlt jedoch in atypischen PKC's und PRK's (Mellor und Parker, 1998), tritt aber in den PKC-Homologen von *S. cerevisiae* und *S. pombe* auf. Hier liegen jedoch noch keine Untersuchungen zur Phosphorylierung dieser Reste vor.

### 1.1.5.2 Die Pseudosubstratbindestelle

Auf diese Region wurde schon kurz in Abschnitt 1.1.1 im Zusammenhang mit der Kinase-Domäne eingegangen. Die kurze Sequenz ist meist homolog mit der bevorzugten Substratsequenz der jeweiligen Proteinkinase C, mit dem Unterschied, daß sich an Stelle des Serins oder Threonins, das im Zielprotein phosphoryliert wird, ein Alaninrest befindet (House und Kemp, 1987). Die Mutation dieses Restes führt zu einer Effektor-unabhängigen Aktivierung des Enzymes (Pears *et al.*, 1990). Eine Pseudosubstratbindestelle ist in den PRK's nicht konserviert.

Neben den in Abschnitt 1.1.5.1 und 1.1.5.2 beschriebenen Regionen wurde von Arellano *et al.* (1999) die Hypothese aufgestellt, daß sich in der HR1-Region von Proteinkinase C-Homologen in *Schizosaccharomyces pombe* noch sogenannte PEST Sequenzen (Prolin-, Glutaminsäure-, Serin- und Threonin-reiche Sequenzen) befinden, die das Protein sensitiv für den proteolytischen Abbau zugänglich machen. Dieser Abbau soll durch die Bindung eines Rho-Proteins verringert werden und zur Stabilisierung des Proteins beitragen.



## 1.2 Proteinkinase C-abhängige Signaltransduktion in Hefe

Während zu den PKC-Enzymen der höheren Eukaryonten vornehmlich Daten aus biochemischen und biophysikalischen Untersuchungen (insbesondere Strukturanalysen) vorliegen, bietet sich ein niederer Eukaryont wie *S. cerevisiae* besonders zur Aufklärung genetischer Zusammenhänge an. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle zunächst ein kurzer Überblick über die an der Proteinkinase C-abhängigen Signaltransduktion in Hefe beteiligten Komponenten und deren Wechselwirkungen gegeben werden (siehe auch Abbildung 1.3).

### 1.2.1 Die Komponenten des *PKC1*-Signaltransduktionsweges

#### 1.2.1.1 Die Proteinkinase C

Das einzige Gen von *S. cerevisiae*, das für ein Proteinkinase C homologes Protein kodiert, wurde zuerst von Levin *et al.* (1990) über die Hybridisierung einer Hefe-Genbank mit cDNA verschiedener Proteinkinasen C aus der Ratte isoliert. In derselben Arbeit wurde als Phänotyp der Deletionsmutanten des Genes ein Zellzyklus-Arrest und osmotische Sensitivität beschrieben. Deren Letalität kann durch die Zugabe osmotischer Stabilisatoren aufgehoben werden. Genauere Analysen zeigten, daß in *pkc1*-Deletionsstämmen die Dicke der Zellwand auf 60% im Vergleich zu Wildtypzellen zurückgeht (Levin *et al.*, 1994). Die Lyse solcher Deletionsmutanten ist auf einen Bruch der Zellwand nahe der Stelle an der eine neue Knospe ausgebildet wird, zurückzuführen. Neben diesen zuerst beschriebenen Phänotypen, wurde das *PKC1*-Gen auch isoliert als das Ziel des spezifischen Proteinkinase C-Inhibitors Staurosporin isoliert (Yoshida *et al.*, 1992).

Neben der Deletion des Genes wurden auch mehrere Punktmutanten des Genes isoliert. Diese liegen entweder in der Kinase-Domäne (Watanabe *et al.*, 1994; Baymiller und McCullough, 1997), einer Phosphorylierungsstelle im Aktivierungsbogen (Inagaki *et al.*, 1999) oder in der regulatorischen C1-Domäne (Jacoby *et al.*, 1997) und zeigen in unterschiedlich starker Ausprägung dieselben Defekte wie die Deletionsmutante. Dazu gehören osmotische Sensitivität, Temperatursensitivität und die Sensitivität gegenüber Substanzen, die auf die Zellwand und/oder Zellmembran destabilisierend wirken (z.B. „Calcofluor white“, Kongorot, SDS). Zusätzlich sind *pkc1*-Mutanten sensitiv gegenüber Koffein, dessen Angriffspunkt in der Zelle nicht genau definiert ist.

Biochemische Untersuchungen der Enzymaktivität von Pkc1p zeigten, daß das Enzym *in vitro* durch die Bindung der kleinen GTPase Rho1p zusammen mit Phosphatidylserin (Kamada *et al.*, 1996), nicht aber durch DAG und Calcium aktiviert werden kann (Antonsson *et al.*,

1994). Dies steht im Widerspruch zu *in vivo*-Untersuchungen, bei denen ein Anstieg der Aktivität des Pkc1p-Signaltransduktionsweges mit einer Erhöhung des zellinternen Spiegels an Diacylglycerol einhergeht (Marini *et al.*, 1996).

Lokalisierungsstudien mit Hilfe einer GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) markierten Variante von Pkc1p (Andrews und Stark, 2000) ergaben eine Rho1p-abhängige Verteilung. Vornehmlich findet sich das Protein an der Seite polaren Wachstums in der Tochterzelle und am Knospenring und ist assoziiert mit Aktinstrukturen. Die Intensität des Signals in der Tochterzelle oszillierte dabei alle acht bis zehn Minuten, was auf eine große Dynamik in der Verteilung des Proteins schließen lässt. Ebenso änderte sich die Lokalisierung von Pkc1p, wenn durch Latrunculin A Schäden an der Struktur des Aktin-zytoskelettes induziert wurden.

### 1.2.1.2 Das MAP-Kinase Modul

Die ankommenden Signale werden von Pkc1p an ein sogenanntes MAP-Kinase-Modul weitergeleitet (zur Übersicht siehe Levin und Errede, 1995; Heinisch *et al.*, 1999; siehe Abbildung 1.3). Dieser Name leitet sich von der im Signalweg am Ende stehenden „Mitogen aktivierten Proteinkinase“ ab, die manchmal auch ERK (für extrazelluläre Signale regulierte Kinase) genannt wird. Die in der Signalkette darüber stehenden Kinasen werden als MEK (MAPK/ERK Kinase) oder MAPK-Kinase bzw. MEKK (MEK Kinase) oder MAPKK-Kinase bezeichnet. MAP-Kinase-Module sind von der Hefe bis zum Säuger hochkonserviert (Widmann *et al.*, 1999), weshalb Ergebnisse häufig von einem Organismus auf einen anderen übertragen werden können.

#### 1.2.1.2.1 Die MAPKK Kinase Bck1p

Der Name *BCK1* steht für „bypass of C kinase“ und ergab sich aus der Fähigkeit dominant aktiver Allele des Genes Wachstumsdefekte der Deletion von *pkc1* zu komplementieren (Lee und Levin, 1992). Bck1p ist wie Pkc1p eine Serin/Threonin-Kinase und wird von dieser an den Resten Serin 939, Threonin 1119 und Serin 1134, sowie 4 weiteren nicht näher definierten Resten phosphoryliert (Levin *et al.*, 1994). Die Kinase-Domäne befindet sich im carboxyterminalen Bereich des Proteins, das im aminoterminalen Bereich ca. 1000 Aminosäuren besitzt, die für die Fähigkeit zur Dimerisierung verantwortlich sind (Paravicini und Friedli, 1996). Weitere regulatorische Bereiche des Proteins sind nicht bekannt.

Die Deletion des Genes führt, wie die von *pkc1*-Mutanten, zu einem osmotisch sensitiven Phänotyp (Lee und Levin, 1992). Daneben sind solche Zellen im haploiden Zustand nicht in der Lage, normale Paarungsprojektionen auszubilden und einen G1-Arrest bei Nahrungsmangel einzuleiten. Im homozygot diploiden Zustand verlieren sie sogar ihre

Fähigkeit zur Sporulation (Costigan *et al.*, 1992). Somit scheint Bck1p neben einer Funktion in der Aufrechterhaltung der Zellintegrität auch eine Funktion in der Wahrnehmung von Nährstoffsignalen zu haben. Wie dieses Signal unabhängig von Pkc1p an Bck1p weitergeleitet wird, ist bislang nicht verstanden.

#### **1.2.1.2.2 Die MAPK-Kinasen Mkk1p und Mkk2p**

Diese beiden dualspezifischen Kinasen wurden ursprünglich als redundantes Paar von Proteinen angesehen, da erst die Deletion beider Gene zu einem *PKC1*-Weg typischen osmoremedialen Lysephänotyp führt (Irie *et al.*, 1993). In der Tat führt die Überexpression je eines der beiden Gene zu einem Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinase Mpk1p. In der Deletion ist diese jedoch nicht im gleichen Maße rückläufig (Martin *et al.*, 2000). Auch bei Dihybrid-Untersuchungen zeigten sich Unterschiede. So interagieren zwar beide Proteine mit den jeweils im Signalfuß über bzw. unter ihnen befindlichen Kinasen Bck1p und Mpk1p aber nur ein Teil von Mkk1p ist auch in der Lage mit Pkc1p zu interagieren (Paravicini und Friedli, 1996). Eventuell übernimmt Mkk1p zusätzlich zu seiner Funktion als Kinase eine ähnliche Gerüstfunktion wie das Ste5-Protein im Paarungspheromonweg.

#### **1.2.1.2.3 Die MAP-Kinase Mpk1p**

Die MAP-Kinase Mpk1p ist die letzte Kinase in der sequenziellen Phosphorylierungsfolge des nach ihr benannten MAP-Kinase-Moduls. Der offizielle Name des codierenden Genes ist *SLT2*. Dieser Name leitet sich von dem Namen der Mutanten *lyt2* ab, als deren Suppressor es ursprünglich isoliert wurde (Torres *et al.*, 1991). Diese Autoren vermuteten auch erstmals eine Beteiligung des korrespondierenden Proteines an der Aufrechterhaltung der Integrität der Zellwand. Diese Annahme wurde unter anderem dadurch bestätigt, daß Lee *et al.* (1993) es unter dem zumeist gebräuchlichen Namen *MPK1* als Hochkopienzahl-suppressor des Lyse-Phänotyps einer *bck1*-Deletion isolierten. Später zeigte sich, daß Mpk1p wahrscheinlich an den Resten Threonin 190 und Tyrosin 192 von Mkk1p bzw. Mkk2p phosphoryliert wird (de Nobel *et al.*, 2000). Setzt man Zellen einem Hitzeschock oder Chemikalien gegen die Mutanten im Pkc1p-Weg sensitiv sind, wie z.B. Koffein oder „Calcofluor white“, aus, so kommt es zu einem Anstieg in der Phosphorylierung von Mpk1p (Ketela *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000).

### 1.2.1.3 Transkriptionsfaktoren

Als Zielproteine der MAP-Kinase Mpk1p sind zwei Transkriptionsfaktoren bekannt (siehe Abbildung 1.3). Der erste wird durch das *RLM1*-Gen kodiert. Das Rlm1p Protein wird auf Grund von Homologien im aminoterminalen Bereich zur Familie der MADS (*MCM1*, *Agamous*, *Deficiens* and *Serum factor*)-Box-Transkriptionsfaktoren gezählt (West und Sharrocks, 1999) und aktiviert wahrscheinlich in erster Linie die Transkription der Gene, die für die Aufrechterhaltung der Zellwand benötigt werden. Die Überproduktion nur der DNA-Bindedomäne führt zu einem osmoremedialen Phänotyp, ähnlich dem von Mutanten im Pkc1p-Weg, (Dodou und Treisman, 1997). Zusätzlich dazu reguliert Rlm1p auch seine eigene Transkription. (Dodou und Treisman, 1997). Wurde die Beteiligung von *RLM1* an der Proteinkinase C vermittelten Signaltransduktion zunächst nur über genetische Ansätze gezeigt (Watanabe *et al.*, 1995), bestätigten später Dihybrid Untersuchungen und der Nachweis von *in vitro*- und *in vivo*-Phosphorylierung die Aktivierung durch Mpk1p (Watanabe *et al.*, 1995, Dodou und Treisman, 1997).

Der zweite Transkriptionsfaktor, für den eine Beteiligung an der Signaltransduktion im Pkc1p-Weg nachgewiesen wurde, ist der von den Genen *SWI4* und *SWI6* kodierte, heterodimere SBF-Komplex (*SCB*-bindender Faktor; Madden *et al.*, 1997). Dieser Komplex scheint für die Beteiligung von Pkc1p an der Regulation von Vorgängen während des Zellzyklus verantwortlich zu sein, da er die Expression der Gene der G1-Cycline *CLN1*, *CLN2*, *PCL1* und *PCL2* reguliert (Ogas *et al.*, 1991; Espinoza *et al.*, 1994; Dirick *et al.*, 1995). Daneben reguliert dieser Komplex wohl auch Gene, deren Produkte für die Zellwand benötigt werden (Igual *et al.*, 1996).

### 1.2.1.4 Aktivatoren des Pkc1p Signaltransduktionsweges

Nach der Isolierung des *PKCI*-Genes wurde auf Grund der Sequenzhomologien eine Aktivierung des Proteins angenommen, die ähnlich der Aktivierung der Säugerenzyme durch die Bindung von Diacylglycerol verläuft (Levin *et al.*, 1990). Weitere Hinweise darauf lieferte die Arbeit von Marini *et al.*, 1996. Mittlerweile sind jedoch zahlreiche Proteine beschrieben, die den Pkc1p-Weg unabhängig von DAG aktivieren (siehe Abbildung 1.3). Auf diese Komponenten wird im Folgenden näher eingegangen.

#### 1.2.1.4.1 Die kleine GTPase Rho1p

Wie schon in Abschnitt 1.1.2 und 1.2.1.1 erwähnt, interagiert Rho1p mit Pkc1p, was zu dessen Aktivierung führt (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). Auf Grund von Homologievergleichen läßt sich Rho1p in die Familie der Rho (*Ras* *Homolog*)-Proteine in der

Ras (Ratten Sarkom)-Superfamilie einordnen (siehe Symons (1996) für eine Übersicht). Diese Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-35 kDa liegen entweder in einem GDP- oder in einem GTP-gebundenen Zustand vor und werden auch als molekulare Schalter bezeichnet (Bourne *et al.*, 1991). Der GDP-gebundene Zustand wird dabei als inaktiver, der GTP-gebundene Zustand als aktiver Zustand angesehen. Rho-Proteine besitzen zwar eine intrinsische GTPase Aktivität, jedoch läuft die Reaktion ohne die Hilfe sogenannter GAP-Enzyme (GTPase aktivierendes Protein) nur sehr langsam ab. Auch der Austausch von GDP zu GTP erfolgt nur mit Hilfe eines weiteren Proteins des sogenannten GEF („GDP-GTP exchange factor“). Ein weiteres Enzym, das regulatorisch in diesen Zyklus eingreift, ist das sogenannte GDI (GDP-Dissoziations Inhibitor)-Protein, das die Dissoziation von GDP verhindert und somit das Protein in seinem inaktiven Zustand hält (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Entsprechende Enzyme sind für Rho1p in *S. cerevisiae* identifiziert und in Abschnitt 1.2.1.4.2 beschrieben.

Die aktive, GTP-gebundene Form der Proteine bindet an sogenannte Effektorproteine und aktiviert diese. Dies wurde im Falle von Rho1p für Pkc1p (Nonaka *et al.*, 1995), Fks1p (Mazur und Baginsky, 1996; Inoue *et al.*, 1999), Gsc2p (Mazur und Baginsky, 1996) und Skn7p (Alberts *et al.*, 1998) gezeigt. Durch die Analyse von mutanten Allelen wurde deutlich, daß in Rho1p nicht nur die zur Bindung von GTP notwendigen Reste konserviert sind, sondern weitere strukturbestimmende Reste ebenfalls vorhanden sind, deren Mutation zu konstitutiv aktiven bzw. inaktiven Varianten des Enzymes führt. Daueraktive Mutanten sind z.B. Rho1p Q<sub>68</sub>H (Madaule *et al.*, 1987) und Rho1p G<sub>19</sub>V (Jöckel, 1999). Zu einem dominant negativen Phänotyp führt der Austausch des Glutaminsäurerestes an Position 45 (Rho1p E<sub>45</sub>I, Drgonova *et al.*, 1999; Rho1p E<sub>45</sub>A, Jöckel, 1999).

Desweiteren ist die Erkennungssequenz für eine carboxyterminale Lipidmodifikation (CAAX) konserviert, die für die Membranlokalisierung der Proteine von Bedeutung ist. Im Fall von Rho1p handelt es sich hierbei um einen Geranylgeranylrest (Ohya *et al.*, 1993). Wird diese Modifikation durch Mutagenese der Erkennungssequenz verhindert, ist Rho1p nicht mehr in der Lage mit der Untereinheit des Glukansynthasekomplexes Fks1p zu interagieren (Inoue *et al.*, 1999). Die Lokalisierung von Rho1p ist während des Wachstums der Zellen und bei der Ausbildung der Paarungsprojektion polarisiert (Yamochi *et al.*, 1994; Ayscough und Drubin, 1998) und stimmt mit der Lokalisierung des Aktins überein. An diesen Ort wird das Protein wahrscheinlich durch seine Interaktion mit Bni1p dirigiert (Kohno *et al.*, 1996; Imamura *et al.*, 1997), welches wiederum über Profilin Pfy1p mit Aktin in Verbindung steht.

#### 1.2.1.4.2 Regulatoren von Rho1p

Da nur die GTP gebundene Form von Rho1p die Proteinkinase C bindet und aktiviert, kommt der Regulation des Zustandes von Rho1p eine entscheidende Aufgabe auch der Regulation der Aktivität des Pkc1p-Weges zu. Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, haben hierbei die zur Familie der GEF, GAP und GDI gehörenden Proteine eine besondere Bedeutung.

Als GEF für Rho1p wurden die Genprodukte von *ROM1* und *ROM2* durch ihre Fähigkeit identifiziert, in hoher Kopienzahl den Wachstumsdefekt eines dominant negativen Allels von *rho1* zu komplementieren (Ozaki *et al.*, 1996). Deletionen von *rom1* und *rom2* sind synthetisch letal, eine Deletion von *rom1* ist im Gegensatz zu einer Deletion von *rom2* nicht temperatursensitiv (Ozaki *et al.*, 1996) und die Überexpression von *ROM1* kann diesen Phänotyp einer *rom2* Deletion auch nicht komplementieren (Heinisch *et al.*, 1999). Außerdem wurde das *ROM2* Gen in einem genetischen Ansatz isoliert, der darauf ausgerichtet war, oberhalb von *BCK1* agierende Komponenten des Pkc1p- Weges zu isolieren (Jacoby, 1997; Lorberg, 2001). Deshalb ist wahrscheinlich Rom2p die wichtigere der beiden Komponenten bei der Aktivierung von Rho1p.

Noch komplexer scheint die Inaktivierung von Rho1p zu sein. So finden sich in der Literatur 4 Gene, für deren Produkte eine Funktion als GAP angenommen wird: *SAC7* (Schmidt *et al.*, 1997), *BEM2* (Wang und Bretscher, 1995), *BAG7* (Schmidt *et al.*, 1997) und *LRG1* (Lorberg, 2001). Die Ergebnisse von Lorberg (2001) legen jedoch nahe, daß nur Sac7p und Lrg1p wesentlich an der Regulation des Pkc1p-Weges beteiligt sind. Auch ein GDI für Rho1p konnte identifiziert werden, das Rdi1p. Dieses Protein bindet im Zytosol an die lipidmodifizierte, GDP-gebundene Form von Rho1p und hält dieses dadurch im inaktiven Zustand (Koch *et al.*, 1997). Folgerichtig führt die Überexpression des Genes auch zu einer Wachstumshemmung (Masuda *et al.*, 1994).

#### 1.2.1.4.3 Signalwahrnehmung oberhalb der Regulatoren von Rho1p

Mittlerweile wurden mehrere membranlokalisierte Proteine identifiziert, für die eine Funktion als Sensor teils angenommen und teils bereits gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 1.3). Zuerst wurde *SLG1* (synthetisch letal mit GAP; auch *HCS77* („high copy suppressor of *swi4*“) oder *WSC1* („cell wall integrity and stress response component)) in drei verschiedenen genetischen Ansätzen isoliert, wobei eine Beteiligung an der Pkc1p-Signaltransduktion, der Zellzykluskontrolle und der Wahrnehmung von Nährstoffen angenommen wird (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998). In der Arbeit von Verna *et al.* (1997) wurde zudem gezeigt, daß *SLG1* zu einer Familie von Genen gehört, zu denen auch *WSC2*, *WSC3* und *WSC4* gerechnet werden, die jedoch nicht in demselben Umfang an der Aktivierung des

Pkc1p-Weges beteiligt zu sein scheinen, wie *SLG1*. Jacoby (1997) konnte zudem *MID2* („mating induced death“) als Suppressor einer *rom2* Mutanten isolieren. Dies wurde durch Arbeiten von Ketela *et al.* (1999) bestätigt, der zeigte, daß Phänotypen einer *mid2* Deletion durch die Überexpression von *SLG1*, *PKC1* und *RHO1* komplementiert werden können. Obwohl sich die Funktionen von Slg1p und Mid2p überlappen, ist Slg1p wohl eher während des vegetativen Wachstums und Mid2p während der Paarung als Sensor von Zellwandstress aktiv (Rajavel *et al.*, 1999). Beide Proteine interagieren im Dihybrid System mit Rom2p (Philip und Levin, 2001) und aktivieren so Rho1p. Über Homologievergleiche wurde ein weiteres zu *MID2* homologes Gen identifiziert (Rajavel *et al.*, 1999, Ketela *et al.*, 1999). Die Deletion dieses Genes in Kombination mit der, des *mid2* Genes führt zu einem osmotisch sensitiven Phänotyp, während sich keine genetische Interaktion mit *SLG1* nachweisen läßt (Ketela *et al.*, 1999).

Die Aktivierung des Pkc1p-Weges durch Tor2p („target of rapamycin“; Helliwell *et al.*, 1998b) läuft ebenfalls über Rom2p. Tor2p ist ein Phosphatidylinositol-4 kinase homologes Protein und übernimmt durch die Aktivierung des Pkc1p-Weges die Zellzyklus-abhängige Regulation des Aktins . Daneben besitzt Tor2p noch eine Funktion , die es sich mit seinem Homologen Tor1p teilt. Diese besteht in der Aktivierung der Translationsinitiation bei Eintritt in die G1-Phase des Zellzyklus (Helliwell *et al.*, 1998a; Barbet *et al.*, 1996).

#### **1.2.1.4.4 Rho1p unabhängige Aktivierung von Pkc1p**

Wie schon in Abschnitt 1.1.1 erwähnt, wird Pkc1p in Hefe, wie seine Säugerhomologen, auch durch die PDK1-homologe Proteinkinase Pkh2p phosphoryliert und aktiviert (Inagaki *et al.*, 1999, siehe Abbildung 1.3). Durch Bindung von Phosphatidylserin kann die Aktivierung durch Rho1p gesteigert werden. Ein aktivierender Einfluß durch Moleküle des Lipidmetabolismus wird durch verschiedene genetische Untersuchungen nahegelegt. So können Defekte von *pkc1-4* Mutanten durch *KCS1* komplementiert werden (Huang und Symington, 1995). Das hiervon kodierte Protein ist eine Inositol-(1,2,3,4,5,6)-Hexaphosphat-Kinase (Saiardi *et al.*, 1999). Eine weitere genetische Wechselwirkung existiert mit *STT4*. Dieses Gen kodiert für eine Phosphatidylinositol-4-kinase und seine Deletion kann durch die Überexpression von *PKC1* komplementiert werden (Yoshida *et al.*, 1994).

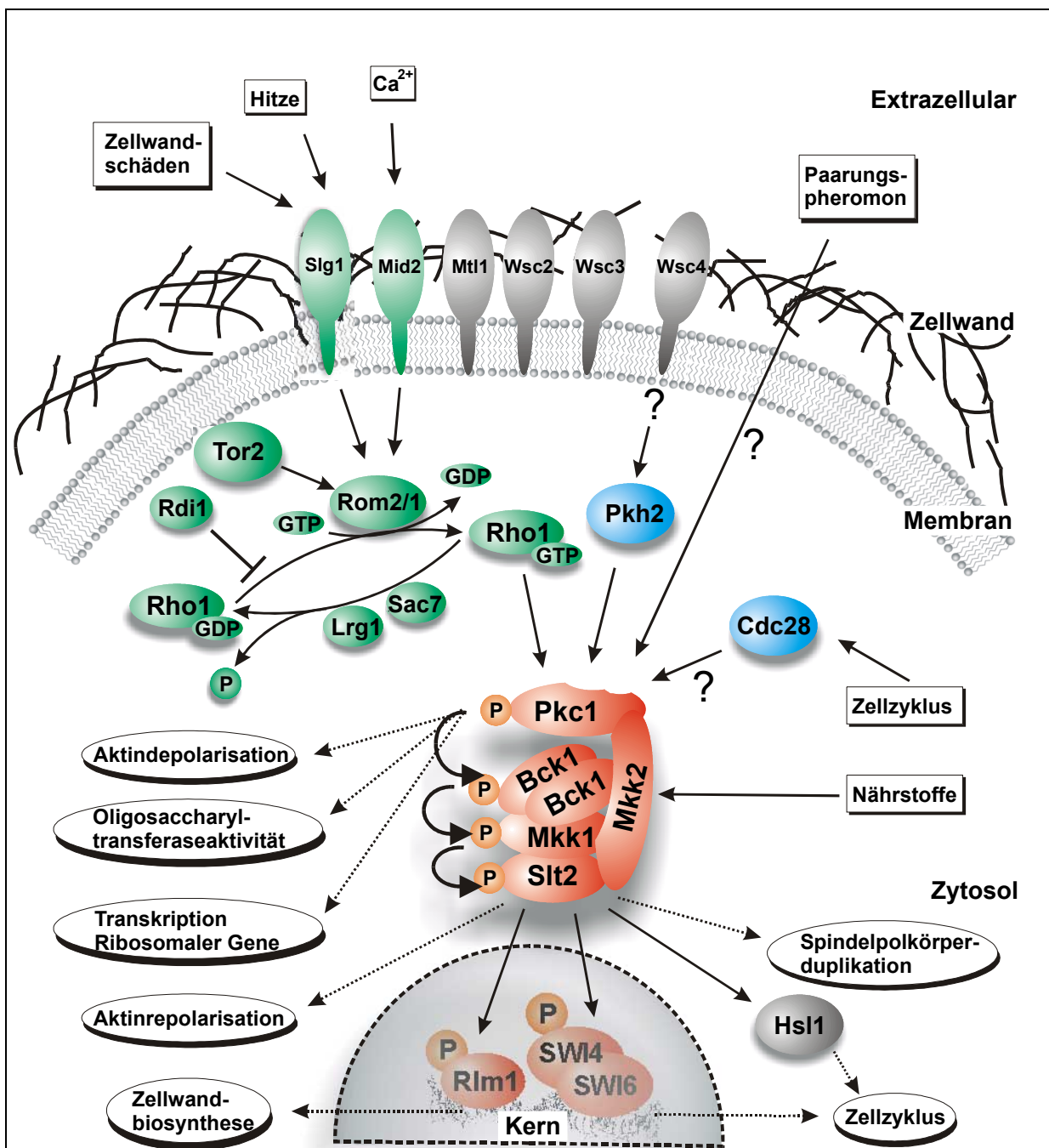
### 1.2.1.5 Aktivitätshemmende Komponenten

Für die schnelle Reaktion der Zelle auf Signale ist nicht nur die Aktivierung sondern auch die Inaktivierung des Weges von Bedeutung. Diese ist jedoch im Gegensatz zu der Aktivierung weniger gut untersucht. Neben den in Abschnitt 1.2.1.4.2 erwähnten negativen Regulatoren von Rho1p muß hier vor allem *MSG5* genannt werden, welches als Suppressor der Überexpression eines daueraktiven Allels von *mkk1* isoliert wurde (Watanabe *et al.*, 1995) und für eine dualspezifische Phosphatase kodiert. Die Deletion des Genes führt zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Mpk1p (Martin *et al.*, 2000). Auch bei Ptp2p und Ptp3p handelt es sich um Phosphatasen, die beide in der Lage sind Mpk1p *in vivo* und *in vitro* zu dephosphorylieren (Mattison *et al.*, 1999).

### 1.2.2 Einfließende Signale

Zu Beginn der Arbeiten wurde zunächst die Wahrnehmung niedriger Osmolarität durch den *PKC1*-Weg beschrieben (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini *et al.*, 1992). Mit der Zeit kamen weitere Signale hinzu, so daß zum jetzigen Zeitpunkt ca. sechs Signale bekannt sind, die in den Pkc1p-Weg einfließen (siehe Abbildung 1.3). Einige der Signale stehen dabei in Abhängigkeit zueinander, so z.B. die Wahrnehmung niedriger Osmolarität und Hitzestress, die letztendlich auch zu Zellwandschäden führen (Delley und Hall, 1999). Neben diesen Signalen führt auch die Anwesenheit von Paarungspheromon zu einer Aktivierung des Pkc1p-Weges, die wahrscheinlich über eine Quervernetzung mit dem Signaltransduktionsweg der Paarung erfolgt (Buehrer und Errede, 1997). Ein weiteres Signal, das zu einer Phosphorylierung der MAP-Kinase Mpk1p führt, ist eine Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration (Mizunuma *et al.*, 1998).





**Abbildung 1.3: Übersicht über die Pkc1p-abhängige Signaltransduktion in *S. cerevisiae***

Die Abbildung fasst die im Text geschilderten Abhängigkeiten zusammen. Aktivierende Signale sind durch Rechtecke markiert. Ausgehende Signale sind durch Ovale gekennzeichnet. Die Hauptkomponenten des Weges sind rot dargestellt. Komponenten, die an der Rho1p-abhängigen Aktivierung beteiligt sind, sind grün markiert, Komponenten der Rho1p-unabhängigen Aktivierung blau. Alle übrigen Komponenten sind grau dargestellt

## 1.2.2 Ausgehende Signale

Genauso vielfältig, wie die in den Weg einfließenden Signale sind die vom Pkc1p-Weg ausgehenden (siehe Abbildung 1.3). Dabei kann man zwei Klassen von ausgehenden Signalen unterscheiden:

Die erste Klasse umfaßt Signale, die über den MAP-Kinase-Weg weitergeleitet werden, die zweite Klasse umfaßt Signale die von Pkc1p unabhängig vom MAP-Kinase-Weg weitergegeben werden. Zu der ersten Klasse gehört die transkriptionelle Regulation von Genen, die durch die in Abschnitt 1.2.1.3 beschriebenen Transkriptionsfaktoren vermittelt wird. Weitere Signale, die von Mpk1p vermittelt werden, sind die Repolarisation von Aktin (Delley und Hall, 1999), die Hemmung der Proteinkinase Hsl1p, die letztlich zum Übergang von G2 nach M im Zellzyklus führt (Mizunuma *et al.*, 1998), und die Duplikation der Spindelpolkörper (Stirling und Stark, 2000, Khalfan *et al.*, 2000). Wahrscheinlich von Pkc1p direkt vermittelt werden die Aktinrepolarisation (Delley und Hall, 1999), die Regulation der Transkription ribosomaler Gene (Li *et al.*, 2000) und die Regulation der Oligosaccharyltransferaseaktivität (Park und Lennarz, 2000).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorherigen Abschnitten geschildert, kommt der Proteinkinase C in der Hefe eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Zellfunktionen zu. Diese Rolle erfordert eine komplexe Regulation des Enzymes. Die Aufklärung des Ablaufes dieser Regulation und die Aufklärung daran beteiligter Komponenten kann dabei auch wertvolle Informationen über die Regulation und Evolution anderer Enzyme der Proteinkinase C „Superfamilie“ liefern. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit insbesondere untersucht werden:

- i) Die Zusammenhänge der Regulation des Enzymes an der C1-Domäne, in Fortsetzung der Arbeit von Jacoby *et al.* (1997). Hierzu sollten insbesondere verschiedene Mutanten der Cystein-reichen Domäne hergestellt und charakterisiert werden.
- ii) Die Untersuchung der aminoterminalen Region von Pkc1p auf das eventuelle Vorhandensein einer regulatorischen Funktion. Zu diesem Zweck sollten Mutanten im aminoterminalen Bereich identifiziert werden, die *PKC1*-Weg-typische Defekte zeigen. Mit Hilfe dieser Mutanten sollte dann die Aktivierung des Enzymes weiter aufgeklärt werden.
- iii) Die Entwicklung und Durchführung eines Ansatzes zur Identifikation von Komponenten, die möglicherweise negative regulatorische Funktion besitzen oder wichtig sind zur Aufrechterhaltung der zellulären Integrität. Hierbei sollte im Gegensatz zu den meisten Untersuchungen, die auf Wachstumsdefekten beruhen, ein Reportersystem konstruiert und eingesetzt werden und somit auch Mutanten identifiziert werden, deren Defekte keine phänotypische Ausprägung zeigen.

## 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 [Disodium 3-(4-methoxy spiro[1, 2-dioxetane-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), Heringssperma-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), [ $\gamma^{32}$ -P]-ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), 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), Trichloressigsäure (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>™</sup> High Fidelity PCR System" (Roche, Mannheim), Glasperlen [ $\varnothing$  = 0,45 - 0,5 mm; B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen], Glutathion-Sephrose (Pharmacia), "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche, Mannheim), "High Pure PCR Product Purification Kit" (Roche, Mannheim), Hybond<sup>™</sup>-N Nylon Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), MAGmol Protein G Microbeads und  $\mu$ MACs „columns“ (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach), 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 der Firmen Roche (Mannheim), Gibco BRL (Gaithersburg MD USA), MBI Fermentas (St.Leon-Rot) oder New England Biolabs Inc. (Frankfurt) wurden verwendet. Desweiteren wurden folgende Enzyme eingesetzt: 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-Säulen-gereinigter 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)
PKC1 (yC-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) ein in Ziegen hergestellter polyklonaler Antikörper, der gegen das Pkc1p-Protein aus <i>S. cerevisiae</i> gerichtet ist	in Esel hergestelltes, Peroxidase-konjugiertes anti-Ziege IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg)

**Tabelle 2.1: Verwendete Antikörper.**

## 2.1.2 Stämme und Medien

### 2.1.2.1 Hefestämme

#### 2.1.2.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* -Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
MCY-7B (MCH-7B)	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	Jacoby <i>et al.</i> , 1999
MCY-22D	<i>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> ura3-52/ura3-52 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP/<math>\Delta</math>trp1::loxP MAL/MAL SUC/SUC GAL/GAL</i> (korrespondierender diploider Stamm zu MCY-7B)	J. Heinisch, persönliche Mitteilung

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Quelle</b>
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>	diese Arbeit
MCY-27B	<i>MATa/MATα ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 trp1::loxP URA3::pLEXAox5 RLM1::YIpRLM1 MAL GAL SUC</i>	Jacoby <i>et al.</i> , 1999
MCY-43A	<i>MATa ura3-52 his3-11,15 leu2-3::pHPS103[LEU2], 112 trp1::loxP pkc1::HIS3 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-44A	<i>MATa ura3-52 his3-11,15 leu2-3::pHPS105[LEU2], 112 trp1::loxP pkc1::HIS3 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-46A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS13, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 RLM1::YIpRLM1 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-47B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112, [pHPS23, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 RLM1::YIpRLM1 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
DL40	<i>MATα/a 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
TN1	<i>MATα YHM2p::mTn3-YHM2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN2	<i>MATα HXT7p::mTn3-HXT6 yor356w::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN4	<i>MATα YJL105Wp::mTN3-IME2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN5	<i>MATα YHR120Cp::mTN3-FLO5p ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN6	<i>MATα asp3::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN7	<i>MATα fig4::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN8	<i>MATα ena2::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 Δtrp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Quelle
TN9	<i>MAT<math>\alpha</math> nta1::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN10	<i>MAT<math>\alpha</math> ygp1::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN12	<i>MAT<math>\alpha</math> YFR044Cp::mTN3-YFR045Wp ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN13	<i>MAT<math>\alpha</math> age1::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN14	<i>MAT<math>\alpha</math> asp3::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN15	<i>MAT<math>\alpha</math> YHM2p::mTn3-YHM2 asp3::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN16	<i>MAT<math>\alpha</math> YHM2p::mTn3-YHM2 ena2::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN17	<i>MAT<math>\alpha</math> YHM2p::mTn3-YHM2 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN18	<i>MAT<math>\alpha</math> yjl017w::mTn3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN19	<i>MAT<math>\alpha</math> pho11::mTN3 (pho12::mTN3?) ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN23	<i>MAT<math>\alpha</math> ydr357c::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN24	<i>MAT<math>\alpha</math> ynl152w::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit
TN27	<i>MAT<math>\alpha</math> HXT7p::mTn3-HXT6 yor356w::mTN3 ura3-52 leu2-3,112 his3-11,15 <math>\Delta</math>trp1::loxP MAL SUC GAL</i>	diese Arbeit

Die im Folgenden aufgeführten Hefestämme unterscheiden sich lediglich in dem Plasmid, das sie tragen. Sie wurden trotzdem hier aufgeführt, da sie nicht aus einer Transformation hervorgingen, sondern Segreganten transformierter Zellen von MCY-23D sind:

MCY-48A	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>pkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS72 LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-48B	<i>MAT<math>\alpha</math> <math>\Delta</math>pkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS72, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Quelle</b>
MCY-49A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS65, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-49B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS65, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-50A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS62, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-50B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS62, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-51A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS69, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-51B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS69, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-52A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS63, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-52B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS63, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-53A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS64, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-53B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS64, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-54A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS129, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-54B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS129, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-55A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS111, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-55B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS111, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-56A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS112, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit



Stamm	Genotyp	Quelle
MCY-56B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS112, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-57A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS114, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-57B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS114, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-58A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS98, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-58B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS98, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-59A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS99, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-59B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS99, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-60A	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS73, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit
MCY-60B	<i>MATa Δpkc1::HIS3 leu2-3,112 [pHPS73, LEU2] trp1::loxP URA3::pLEXAox5 MAL GAL SUC</i>	diese Arbeit

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete Hefestämme

### 2.1.2.1.2 Medien und Anzuchtbedingungen

Vollmedium (YEP) : 1% Hefeextrakt, 2% Pepton 190 (beides Gibco/BRL),

Kohlenstoffquelle:

YEPD: 2% Glucose

YEPGal: 2% Galaktose

Minimalmedium : 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids (YNB)

Aminosäurebedürfnisse wie bei Zimmermann (1975) beschrieben;

Kohlenstoffquelle: je nach Bedarf 2% Glucose, 2% Galaktose oder 2% Raffinose

Sporulationsmedium : Minimalmedium ohne Aminosäuren mit 0,2M Kaliumacetat

Platten wurden mit 2% Agar hergestellt. Die Anzucht erfolgte bei 30°C, wenn nicht anders vermerkt. Kongorot (Merck), Koffein (Sigma), „Calcofluor White“ (Sigma) und „Sodiumdodecylsulfat“ (SDS) wurden in der im Ergebnisteil angegebenen Konzentration vor dem Gießen der Platten zugegeben.

### 2.1.2.1.3 Lagerung der Hefestämme

Die Hefestämme wurden auf Agarplatten bei 4°C aufbewahrt und ca. alle 2 Monate auf frische Nährböden überimpft. Zusätzlich wurden Glycerinkulturen erstellt. Dazu wurden 500µl frische Übernacht-Kultur mit 1ml 33%iger, steriler Glycerin-Lösung versetzt und dann bei -70°C gelagert.

### 2.1.2.2 E.coli-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5αF'	F' Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>endA1 recA1 hsdR17(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>) deoR thi-1</i> <i>supE44 λ<sup>-</sup> gyrA96 relA1</i>	GIBCO BRL (Gaithersburg MD USA)
SURE	<i>e14<sup>-</sup> (McrA<sup>-</sup>) D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171</i> <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB</i> <i>recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F'</i> <i>proAB lacI<sup>d</sup>ZD(M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene (La Jolla Kalifornien)

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

#### 2.1.2.2.1 Medien zur Anzucht der Bakterienstämme

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

Um plasmidhaltige Zellen zu selektionieren, wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 50µg/ml oder Kanamycin in einer Konzentration von 20µg/ml zugegeben. Bei der Herstellung von festen Nährböden wurde dem Medium noch 2% Agar zugefügt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C. Bei Bedarf wurden 100µl einer IPTG/X-Gal-Stammlösung (2,4mg/ml IPTG , 10mg/ml X-Gal in Dimethylformamid gelöst) auf den Platten ausgestrichen.

### 2.1.2.2 Lagerung der Bakterienstämme

Die Bakterienstämme wurden auf den Agarplatten längstens 2 Monate bei 4°C gelagert.

## 2.1.3 Plasmide und Genbanken

### 2.1.3.1 Ausgangsplasmide

#### 2.1.3.1.1 *E. coli*-Vektoren

Name	Selektionsmarker/ Replikationsrsprung	Beschreibung	Quelle
pBluescript SK+	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor	Stratagene (La Jolla, Kalifornien)
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
pFA6a-GFP- <i>HIS3</i>	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>KanMX<sup>R</sup></i>	Plasmid, das für das Grünfluoreszierende-Protein kodiert, terminiert vom <i>ADHI</i> -Terminator und als Selektionsmarker das <i>S. pombe HIS3</i> -Gen unter der Kontrolle des heterologen <i>Ashbya gossypii</i> -TEF-Promotors und den TEF-Terminator enthält	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFA6a-kanMX6-Gst	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>KanMX<sup>R</sup></i>	Plasmid, das für Glutathion-S-Transferase 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
pGEX-3x	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Vektor für aminoterminale Fusionen an Glutathion-S-Transferase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pHPS18	<i>Amp<sup>R</sup></i>	Auf pUC19 basierender Vektor. enthält <i>XbaI</i> Fragment aus <i>PKC1</i>	Jacoby <i>et al.</i> , 1997
pHPS27	<i>Kan<sup>R</sup></i>	pUK21 enthält <i>pkc1</i> für C <sub>434</sub> , <sub>437</sub> S/C <sub>514,517</sub> S Mutante hinter <i>GALI/10</i> Promotor	Jacoby <i>et al.</i> , 1997
pHPS28	<i>Kan<sup>R</sup></i>	pUK21 enthält <i>PKC1</i> hinter <i>GALI/10</i> Promotor	Jacoby <i>et al.</i> , 1997
pKPKC1	<i>Kan<sup>R</sup></i>	Auf pUK1921 basierender Vektor mit <i>SphI</i> <i>PKC1</i> Fragment	Jacoby, 1997
pKPKChis	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>HIS3</i>	Auf pUK1921 basierender Vektor mit <i>PKC1::HIS3</i> Deletionskonstrukt	Jacoby, 1997

Name	Selektionsmarker/ Replikationsrsprung	Beschreibung	Quelle
pQE9	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	Vektor zur Markierung von Proteinen mit sechs Histidinresten	(Qiagen, Hilden)
pUC18	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pUC19RHO5hin	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E. coli</i> -Vektor mit genomischen Fragment von <i>RHO5</i>	Jürgen Heinisch
pUC21	<i>Amp<sup>R</sup></i>	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor	Vieira und Messing, 1991
pUK1921	<i>Kan<sup>R</sup></i>	<i>E.coli</i> -Klonierungsvektor	Heinisch, 1993

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Ausgangsplasmide

### 2.1.3.1.1 *S. cerevisiae*-Vektoren

Name	Selektionsmarker/ Replikationsrsprung	Beschreibung	Quelle
LexAox5lacZ	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i>	Integrativer Vektor mit fünf LexA-Bindestellen vor dem <i>lacZ</i> -Gen	Ruden <i>et al.</i> , 1991
pBTM116-HA-CDC42ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-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> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-DNA-Bindedomänen-HA-Cdc42ΔC(G12V)-Fusions-protein kodiert	Imamura <i>et al.</i> , 1997
pBTM116-HA-RHO2ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-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> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-DNA-Bindedomänen-HA-Rho2ΔC(Q65L)-Fusions-protein kodiert	Imamura <i>et al.</i> , 1997
pBTM116-HA-RHO3ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-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> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-DNA-Bindedomänen-HA-Rho3ΔC(Q74L)-Fusions-protein kodiert	Imamura <i>et al.</i> , 1997
pBTM116-HA-RHO4ΔC	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-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> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein lexA-DNA-Bindedomänen-HA-Rho4ΔC(Q70L)-Fusions-protein kodiert	Imamura <i>et al.</i> , 1997

Name	Selektionsmarker/ Replikationsrsprung	Beschreibung	Quelle
pBTM116-HA-RHO4ΔC (T25N)	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> 2μ	pBTM116-Derivat, das für ein <i>lexA</i> -DNA-Bindedomänen-HA-Rho4ΔC(T25N)-Fusions-protein kodiert	Imamura <i>et al.</i> , 1997
pBTM116RLM1	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> 2μ	Auf pBTM116 basierender Vektor. enthält <i>rlm1ΔN-LexA</i> Fusion	Jacoby <i>et al.</i> , 1999
pGAD424	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>LEU2</i> 2μ	Vektor, der die für die Transkriptionsaktivierungsdomäne des Gal4-Proteins kodierende Sequenz unter der Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors enthält mit <i>ADHI</i> -Terminator	Bartel <i>et al.</i> , 1993
pGADPKC	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>LEU2</i> 2μ	pGAD424 mit <i>PKC1</i> Fusion an die <i>GAL4</i> Aktivierungsdomäne	Jörg Jacoby
pGBT9	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> 2μ	Vektor, der die für die DNA-Binde-Domäne des Gal4-Proteins kodierende Sequenz unter der Kontrolle des <i>ADHI</i> -Promotors enthält mit <i>ADHI</i> -Terminator	Bartel <i>et al.</i> , 1993
pHPS29	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> <i>CEN/ARS</i>	Aminoterminal an <i>pkc1 C1</i> Mutante fusioniertes Epitop von Haemagglutinin	Jacoby <i>et al.</i> , 1997
pJJH447	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> 2μ	YEp352-Derivat, das den <i>GALI</i> -Promotor enthält	Jürgen Heinisch
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
YCplac111	<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
YCplac22	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>TRP1</i> <i>CEN/ARS</i>	<i>E.coli/S.cerevisiae</i> -”Shuttle-Vektor”	Gietz und Sugino, 1988
YEp352	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> 2μ	Hochkopienzahl <i>E.coli/S.cerevisiae</i> -”Shuttle-Vektor”	Hill <i>et al.</i> , 1986
YIp358r	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i>	Integrativer Vektor zur Fusion mit dem <i>lacZ</i> Gen	Myers <i>et al.</i> , 1986
YIp5	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>URA3</i> <i>Tet<sup>R</sup></i>	ursprünglich isolierter, integrativer Vektor	Struhl <i>et al.</i> , 1979
YIplac128	<i>Amp<sup>R</sup></i> <i>LEU2</i>	Integrativer <i>E.coli/S.cerevisiae</i> -”Shuttle-Vektor”	Gietz und Sugino, 1988

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete Hefe-Ausgangsplasmide

## 2.1.3.2 Plasmidkonstruktionen

Name	Rückgrat		Fragment	
	Vektor	Restriktion	Inhalt	Restriktion
pHPS14	pUC21	<i>SalI/NsiI</i>	PCR von genomischer DNA mit RHO1-3 und RHO1-5	<i>SalI/NsiI</i>
pHPS39	pGBT9	<i>BamHI/PstI</i>	PCR Produkt von pJG4-5RHO1 (RHO1-3-BamHI, RHO1-5-PstI)	<i>BamHI/PstI</i>
pHPS40	pGBT9	<i>BamHI/PstI</i>	PCR Produkt von pJG4-5rho1Q68H, C206S (RHO1-3-BamHI, RHO1-5-PstI)	<i>BamHI/PstI</i>
pHPS41	YEplac352	<i>BamHI/EcoRI</i>	pHPS14	<i>BglII/EcoRI</i>
pHPS43	pGAD424	<i>NheI/PstI</i>	pHPS29	<i>NheI/PstI</i>
pHPS44	pHPS38	<i>EcoRI</i>	-	religiert
pHPS45	pHPS39	<i>EcoRI</i>	-	religiert
pHPS49	pHPS40	<i>EcoRI</i>	-	religiert
pHPS54	YCplac33	<i>SphI</i>	PKC1 aus pHPS13 (Orientierung: „universal“)	<i>SphI</i>
pHPS55	YCplac33	<i>SphI</i>	PKC1 aus pHPS13 (Orientierung: „reverse“)	<i>SphI</i>
pHPS56	PCR von pHPS18 mit pkc1del5 und pkc1del3	<i>BglII</i>	-	religiert
pHPS58	pHPS13	<i>BamHI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit PKC1-Fragment aus pHPS56	<i>EcoRI</i>
pHPS59	pQE9	<i>BamHI/HinDIII</i>	pHPS40	<i>BamHI/HinDIII</i>
pHPS61	PCR von pKPKC1 mit pkc15delhr1 und pkc13delhr1	<i>BglII</i>	-	religiert
pHPS62	pHSP13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment für C1 C <sub>514,517S</sub> Mutation	<i>EcoRI</i>
pHPS63	pHSP13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment für Raf C1B Mutation	<i>EcoRI</i>
pHPS64	pHSP13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment für Raf C1AB Mutation	<i>EcoRI</i>
pHPS65	pHSP13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment für ΔC1B Mutation	<i>EcoRI</i>
pHPS67	YCplac22	<i>SphI</i>	pBTM116RLM1 (Orientierung: „universal“)	<i>SphI</i>
pHPS68	YCplac22	<i>SphI</i>	pBTM116RLM1 (Orientierung: „reverse“)	<i>SphI</i>
pHPS69	pHPS13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment für Raf C1A Mutation	<i>EcoRI</i>
pHPS70	pHPS13	<i>BamHI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit C1 Fragment aus pHPS56	<i>XbaI/BamHI</i>
pHPS72	pHPS13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment für ΔC1A Mutation	<i>EcoRI</i>
pHPS73	pHPS13	<i>HpaI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment aus pHPS61	<i>SphI/NcoI</i>

Name	Rückgrat		Fragment	
	Vektor	Restriktion	Inhalt	Restriktion
pHPS74	pHPS13	<i>Bam</i> HI	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Fragment für C1 C <sub>434,437</sub> S Mutation	<i>Eco</i> RI
pHPS75	pHPS13	-	<i>in vivo</i> -Rekombination mit PCR Produkt von pFA6a-13Myc-kanMX6 mit PKCR1 und PKCF2	-
pHPS76	YCplac111	<i>Bgl</i> III	mit Klenow-Polymerase aufgefüllt	religiert
pHPS77	pHPS76	<i>Sph</i> I	<i>PKC</i> I aus pHPS73	<i>Sph</i> I
pHPS78	pJH447	<i>Bam</i> HI/ <i>Sph</i> I	pHPS27	<i>Bgl</i> III/ <i>Sph</i> I
pHPS79	pJH447	<i>Bam</i> HI/ <i>Sph</i> I	pHPS28	<i>Bgl</i> III/ <i>Sph</i> I
pHPS80	YIp358r	<i>Sma</i> I/ <i>Sac</i> I	Promotor und Teil von <i>lacZ</i> aus LexAox5 <i>lacZ</i>	<i>Sca</i> I/ <i>Sac</i> I
pHPS81	YCplac22	<i>Sph</i> I/ <i>Pst</i> I	pHPS80	<i>Sph</i> I/ <i>Nsi</i> I
pHPS82	pHPS80	<i>Sph</i> I	<i>rlm</i> 1 aus pHPS68 (Orientierung „reverse“)	<i>Sph</i> I
pHPS83	pHPS80	<i>Sph</i> I	<i>rlm</i> 1 aus pHPS68 (Orientierung „universal“)	<i>Sph</i> I
pHPS84	pGBT9	<i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I	PCR von pHPS13 mit <i>PKC</i> -Gal und <i>PKCHR12Pst</i> I	<i>Bgl</i> III/ <i>Pst</i> I
pHPS85	pUC19	<i>Eco</i> RI	mit Klenow Polymerase aufgefüllt	religiert
pHPS86	pUC18	<i>Eco</i> RI	mit Klenow Polymerase aufgefüllt	religiert
pHPS88	pHPS85	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I	<i>PKC</i> I Fragment aus pHPS13	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
pHPS89	pHPS86	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I	<i>PKC</i> I Fragment aus pHPS13	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
pHPS90	pHPS78	-	<i>in vivo</i> -Rekombination mit PCR Produkt von pFA6a-GFP- <i>HIS3</i> mit PKCR1 und PKCF2	-
pHPS91	pHPS79	-	<i>in vivo</i> -Rekombination mit PCR Produkt von pFA6a-GFP- <i>HIS3</i> mit PKCR1 und PKCF2	-
pHPS93	pHPS85	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I	Fragment von <i>PKC</i> I aus Mutagenese mit HR1A_EMUT	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
pHPS94	pHPS85	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I	Fragment von <i>pkc</i> 1 aus Mutagenese mit HR1LS1	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
pHPS95	pHPS88	<i>Alw</i> NI/ <i>Eco</i> RI	pHPS94	<i>Alw</i> NI/ <i>Eco</i> RI
pHPS96	pHPS88	<i>Alw</i> NI/ <i>Eco</i> RI	pHPS93	<i>Alw</i> NI/ <i>Eco</i> RI
pHPS97	pBlueskript SK+	<i>Hin</i> CII/ <i>Cla</i> I	2,0 kb Fragment aus LexAox5 <i>lacZ</i>	<i>Stu</i> I/ <i>Cla</i> I
pHPS98	pHPS13	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I	pHPS96	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
pHPS99	pHPS13	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I	pHPS95	<i>Xba</i> I/ <i>Pst</i> I
pHPS100	pHPS68	<i>Pst</i> I	Fragmente jeweils aus pHPS97 und pHPS80 Orientierung („reverse“)	<i>Nsi</i> I/ <i>Cla</i> I
pHPS101	pHPS68	<i>Pst</i> I	Fragmente jeweils aus pHPS97 und pHPS80 Orientierung („universal“)	<i>Nsi</i> I/ <i>Cla</i> I
pHPS103	YIplac128	<i>Sph</i> I	pHPS13	<i>Sph</i> I

Name	Rückgrat		Fragment	
	Vektor	Restriktion	Inhalt	Restriktion
pHPS105	YIplac128	<i>SphI</i>	pHPS98	<i>SphI</i>
pHPS106	pHPS41	-	<i>in vivo</i> -Rekombination mit PCR Produkt von pFA6a-kanMX6-Gst mit RHO1-c-tag-5 und RHO1-c-tag-3	-
pHPS108	pGAD424	<i>XmaI/PstI</i>	pHPS84	<i>XmaI/PstI</i>
pHPS111	pHPS13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination für <i>PKCI</i> E <sub>514</sub> A Mutante	<i>EcoRI</i>
pHPS112	pHPS13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination für <i>PKCI</i> D <sub>529</sub> A Mutante	<i>EcoRI</i>
pHPS114	pHPS13	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination für <i>PKCI</i> R <sub>483</sub> A Mutante	<i>EcoRI</i>
pHPS115	pHPS015	<i>NheI/PstI</i>	pHPS104	<i>NheI/PstI</i>
pHPS116	pUC19	<i>SphI</i>	Fragment von <i>rho5</i> aus Mutagenese mit <i>rho5Q91Hneu</i>	<i>SphI</i>
pHPS117	pGAD424	<i>EcoRI/BamHI</i>	PCR von pHPS116 mit <i>RHO5-3Eco</i> und <i>RHO5-5Bam</i>	<i>EcoRI/BamHI</i>
pHPS119	pGBT9	<i>EcoRI/BamHI</i>	PCR von pHPS116 mit <i>RHO5-3Eco</i> und <i>RHO5-5Bam</i>	<i>EcoRI/BamHI</i>
pHPS120	pGBT9	<i>EcoRI/BamHI</i>	PCR von pUC19 <i>RHO5hin</i> mit <i>RHO5-3Eco</i> und <i>RHO5-5Bam</i>	<i>EcoRI/BamHI</i>
pHPS121	pGAD424	<i>XmaI/PstI</i>	PCR von pHPS98 mit <i>PKCGalXma</i> und <i>PKCHR12PstI</i>	<i>XmaI/PstI</i>
pHPS124	pGAD <i>PKC</i>	<i>NheI/SmaI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit <i>PKCI</i> Fragment aus pHPS121	<i>BamHI/BgIII</i>
pHPS125	pGAD <i>PKC</i>	<i>NcoI</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit Raf-C1- Fragment aus pHPS64	<i>HinDIII</i>
pHPS126	pUK1921	<i>XmaI/PstI</i>	pHPS108	<i>XmaI/PstI</i>
pHPS127	pGAD <i>PKC</i>	<i>BamHI/NheI</i>	pHPS129	<i>BamHI/NheI</i>
pHPS128	pUK1921	<i>HinDIII</i>	PCR von pKS1- <i>PKC</i> $\eta$ mit <i>PKCeta5</i> und <i>PKCeta3</i>	<i>HinDIII</i>
pHPS129	pHPS13	<i>HinDIII</i>	pHPS128	<i>HinDIII</i>
pHPS130	pGEX-3x	<i>BamHI</i>	pHPS126	<i>BamHI/BgIII</i>
pHPS131	pHPS59	<i>HinDIII/HinCII</i>	pHPS106	<i>HinDIII/HinCII</i>
pHPS136	pGAD <i>PKC</i>	<i>BamHI/NheI</i>	pHPS58	<i>BamHI/NheI</i>
pHPS137	pHPS136	<i>HinDIII</i>	<i>in vivo</i> -Rekombination mit <i>pkc1</i> -Fragment aus pHPS121	<i>PstI/BgIII</i>
pHPS138	pHPS125	<i>XmaI/XbaI</i>	aufgefüllt mit Klenow-Polymerase	religiert
pHPS139	pHPS127	<i>XmaI/XbaI</i>	aufgefüllt mit Klenow-Polymerase	religiert
pHPS140	pHPS127	<i>XmaI/XbaI</i>	aufgefüllt mit Klenow-Polymerase	religiert

Tabelle 2.6: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide



### 2.1.3.3 Verwendete Transposon-Genbank

Die für diese Arbeit freundlicherweise von M. Snyder zur Verfügung gestellte Transposon-Genbank besteht aus 2-3kb langen, *Sau3A*- Fragmenten in dem Vektor pHSS6, die dann mit dem Transposon Tn3 mutagenisiert wurden (Burns *et al.*, 1994; P.Ross-MacDonald, persönliche Mitteilung).

### 2.1.4 Verwendete Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Name	Sequenz
<i>PKC</i> -GAL	5'- GCG <u>AGA TCT</u> GGG AGC AGT TTA CAG -3'
<i>PKC</i> -GAL <i>Xma</i> I	5'- GGG <u>CCC GGG</u> GGA GCA GTT TAC AG -3'
<i>PKCDAG</i> 1.1	5'- GGT ATA CTG GGT TCC AAT CTC AAG ATT CTA AAT TTT TAT GTC AC -3'
<i>PKCDAG</i> 2	5'- TAC CAG ATT CAG AAG ATT TGC GTA CTT TAT GTC -3'
„universal -40“	5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC -3'
„universal -200“	5'- GGG AAG GGC GAT CGG TGC GGG 3'
„reverse“	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG -3'
<i>PKCR</i> 1	5'- CAA AAA AGA GGC ATT GCA TCA AAA TGG ATA GTT TCA GTT TAT GGA ATT CGA GCT CGT TTA AAC -3'
<i>PKCF</i> 2	5'- GAG TTT AGA GGA TTT TCC TTT ATG CCA GAT GAT TTG GAT TTA CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA -3'
<i>PKCeta</i> 3	5'- GAA TCG TTT TCA GAA TTT TAT TAG CCA TTT CCA TCG ACA TGC AGT TTG GGG CCA CGT TCG -3'
<i>PKCeta</i> 5	5'- CAA TAG GAA AGA AGA GAT ATT CGA ACA GCA TGG CCA CCA CAA GTT CAT GGC CAC ATA C -3'
<i>PKCHR</i> 12 <i>Pst</i>	5'- CCC <u>CTG CAG</u> CAT CTC TAG CAG CAG TTA TTC C -3'
<i>PKCat</i> gout	5'- GAG GGC AGA AGC TCC CCG -3'
<i>pkcc</i> 1del5	5'- CCC <u>CAG ATC</u> TAT GTC GAT GGA AAT GGC -3'
<i>pkcc</i> 1del3	5'- CCC <u>CAG ATC</u> TGT GGC CAT GCT GTT CG -3'

Name	Sequenz
<i>pkcdelhr11</i>	5'- GGA <u>AAG ATC</u> TTT GTG AAA AAC TCA TGA CTG -3'
<i>pkcdelhr12</i>	5'- CAA <u>AGA TCT</u> GAT AAT CAA CAA CCG AAA TTC -3'
<i>PKCHR11</i>	5'- GCT GCG GAG AGA AGC TCT AGC G -3'
<i>RHO5-3neu</i>	5'- CCA TTA CTA TGG TTC AAC CTG G -3'
<i>RHO5-5neu</i>	5'- CCA CAT CGG TAA GTG ATG ACC -3'
<i>rho5Q91H</i>	5'- CAT AAC GGT CTT AAA CGA TTG TAA TCT TCG TGT CCT GCA GTG TCC CAT AAA TTG -3'
<i>HR1LS1</i>	5'- CGT CAA AAT CTT GAG TAC TCG GAG GAT AGC TTA AAA AAA TTA CGG TTG AAG ACC GC -3'
<i>HR1A__EMUT</i>	5'- GGAGCA GAA CAT TAA AAA AAA GAT AGC CGT CG(GCT) AGA AAA TAT TAT TCG GGG -3'
<i>ox5ura</i>	5'- CCA CAG TGT GTG AAC CAA TG -3'
<i>PKC1rev</i>	5'- GGA GAA TTC GGA GAT TTA ATT TCT GGG ATG TAG -3'
<i>RHO1-c-tag-5</i>	5'- GAA GAA CAC TAC TGA AAA GAA GAA GAA GAA GTG TGT CTT GTT ACG GAT CCC CGG GTT AAT TAA -3'
<i>RHO1-c-tag-3</i>	5'- CTT ATA TGT AGA GAA GAA TAA GAT TAT ACA CAT ACT GGG AGG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C -3'
<i>RHOGSTECO</i>	5'- CGA <u>GGG ATC</u> CGG TCA CAA CAA GTT GGT AAC -3'
<i>delta-KCSI-ATG</i>	5'- CTA TGG ATA CCT CTC ACG AAA TTC ATG ATA AAA TAC CCG ATA CAT TAA GAG AGC AGC AGC AGT TCG TAC GCT GCA GGT CGA C -3'
<i>RHO1-5</i>	5'- GGA ATG GGA GAG TCG ACG -3'
<i>RHO1-3</i>	5'- CTG AGG TTG GAG GCT CAG -3'
<i>RHO1-ATG</i>	5'- GCG GGG ATC CGA ATC GCT GTT AGA GG -3'
<i>RHO1-TAG</i>	5'- GGG CAG TAT CTG CCA -3'
<i>GAL1atg</i>	5'- GGC GAA TTC TAT AGT TTT TTC TCC TTG ACG-3'
<i>GAL10atg</i>	5'- CTC GGA TCC TTA TAT TGA ATT TTC -3'
<i>pPKC1-5</i>	5'- GGC TTC GCA TCG CAT CGC -3'
<i>GFPout</i>	5'- CAC CTT CAC CCT CTC C -3'
<i>GFPin</i>	5'- CCC TTT CGA AAG ATC CC -3'

Name	Sequenz
<i>GALad</i>	5'- GTT TGG AAT CAC TAC AGG G -3'
<i>GALbd</i>	5'- GAT TGG CTT CAG TGG AG -3'
<i>RHO1-5BamHI</i>	5'- CCG GAG <u>GAT CCG</u> ATT ATG CCT CTC -3'
<i>RHO1-3PstI</i>	5'- GAC <u>ACT GCA GCT</u> ATA ACA AGA CAG ACT TC -3'
<i>pPKC1-3</i>	5'- ATG GGA CGC AAT CAC GC - 3'
<i>delta-KCSI-TGA</i>	5'- CAA TCA CTA ACT TGA GCA TCG TCA TTG TAT CTT GGT TCA GCG TCG AAA ATA AGC TCG TAC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG -3'

Tabelle 2.7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Transformationen

#### 2.2.1.1 Transformation von *Escherichia coli*

Transformationen von *E.coli* wurden nach der Rubidiumchlorid-Methode durchgeführt (Hanahan *et al.*, 1995).

#### 2.2.1.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Transformationen von *S. cerevisiae* wurden nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz *et al.* (1995) durchgeführt.

### 2.2.2 Sporulation, Tetraden- und Paarungstypanalyse

Zur Sporulation wurden diploide Zellen zunächst in 5 ml YEPD für 1 bis 2 Tage bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 3000rpm abzentrifugiert und auf 1%igen Kaliumacetat-Platten aufgetropft. Nach mikroskopischer Kontrolle der Sporenbildung wurden die Zellen in 500µl sterilem Wasser resuspendiert und 7-12 min mit 5µl Glucoronidase/Arylsulfatase (Roche, Mannheim) inkubiert. Die Sporen wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Bachhofer Typ 4086) auf 2,5%igen Agaroseplättchen getrennt. Zum Auskeimen wurden die Agaroseplättchen auf YEPD bzw. YEPD mit 1M Sorbitol bei

25°C oder 30°C inkubiert. Zur Paarungstypanalyse wurden die Zellen mit zwei Testerstämmen gepaart (LD3R-7B [*MAT $\alpha$  leu1*], SMC-19A [*MAT $\alpha$  leu1*]). Nach Inkubation für 1 Tag bei 30°C wurden die Zellen auf synthetischem Minimalmedium ohne Aminosäure-Zusätze abgestempelt. Unter diesen Bedingungen können nur diploide Zellen wachsen.

### 2.2.3 Wachstumsanalyse mit seriellen Verdünnungsreihen

Zum Test des Wachstums verschiedener Mutanten wurden die Zellen über Nacht bei 25°C in YEPD mit 1M Sorbitol angezogen und anschließend auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 verdünnt und für weitere 4h inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungen erstellt, die jeweils 10.000, 1.000, 100 und 10 Zellen in 5µl enthielten (abweichende Verdünnungen sind im Ergebnisteil angegeben). Die Verdünnungen wurden mit Hilfe eines „Froggers“ auf die unterschiedlichen Medien aufgebracht. Die verwendeten Medien und Konzentrationen der Wirkstoffe sind im Ergebnisteil angegeben.

### 2.2.4 Isolierung Transposon-flankierender Sequenzen

Zur Isolierung Transposon-flankierender Sequenzen wurde der Vektor YIp5 in das Ampicillin-Gen des Transposons integriert (siehe auch Abbildung 3.20). Anschließend wurde die chromosomale DNA isoliert, mit *NsiI* geschnitten und ligiert. Die so erhaltene DNA wurde in *E. coli* transformiert, so daß nur solche DNA mit Resistenzgen und Replikationsursprung amplifiziert wird. Diese Plasmide enthielten zusätzlich zu den Transposon- und Plasmidsequenzen genomische DNA bis zu der dem Integrationsort nächsten genomischen *NsiI*-Schnittstelle. Die isolierten Plasmide wurden mit Hilfe des Oligonukleotids u-200 sequenziert.

### 2.2.5 Analyse von Nukleinsäuren

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

##### 2.2.5.1.1 Plasmid-Isolierung mit Hilfe der „Alkalischen Lyse“

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Sambrook *et al.* (1989), die in einigen Punkten abgewandelt wurde. Zunächst wurde bis zur Zugabe von 3M Kaliumacetat-Lösung und darauffolgender Zentrifugation für 15min bei 13.000rpm (Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) nach der Vorschrift der Firma Qiagen verfahren.

Der so erhaltene Überstand, in dem die DNA enthalten ist, wurde mit 0,8 Volumenteilen Isopropanol versetzt und erneut wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Durch diese Fällung wurde ein Pellet erhalten, das sowohl DNA als auch RNA enthält. Nach Aufnahme des Pellets in 100µl RNase Lösung (50mM Tris/HCl, pH8, 10mM EDTA, 0,1mg/ml RNase A, 150mM NaCl) wurde die RNA durch 20minütige Inkubation bei 37°C entfernt. Nun wurde die Plasmid-DNA erneut gefällt. Diesmal durch Zugabe von 5µl 3M Natriumacetat und 250µl 96% Ethanol und nochmalige Zentrifugation (15min, 13.000rpm, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15). Anschließend wurde die DNA in 50µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### **2.2.5.1.2 Plasmid-Isolierung mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kit“**

Plasmid-DNA die zur Sequenzierung vorgesehen war, wurde mit Hilfe des „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche, Mannheim) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### **2.2.5.1.3 Plasmid-Isolierung durch Qiagen „Midipräparation“**

Plasmid-DNA, die in größeren Mengen benötigt wurde, wurde mit dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen, Hilden, isoliert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers.

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

Die Plasmid-DNA wurde aus 1,5ml einer stationären Hefekultur, die unter selektiven Bedingungen gewachsen war, isoliert. Nach Ernten der Zellen (5min, 5.000rpm, Eppendorf Microfuge) wurden diese in 100µl STET ( 8% Saccharose; 50mM Tris pH8; 50mM EDTA; 5% Triton X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2g Glasperlen (ø 0,45mm) wurden die Zellen 5min aufgeschlossen. Nach Zugabe von weiteren 100µl STET wurde die Suspension kurz gemischt und 3min bei 100°C aufgeköcht. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10min, 4°C, 13.000rpm, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15). Zu 100µl des Überstandes wurden 50µl einer 7,5M Ammoniumacetat-Lösung hinzugefügt. Während einer einstündigen Inkubation bei -20°C wurden chromosomale DNA, große RNAs und andere Unreinheiten präzipitiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (4°C, 13.000rpm, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) wurden 100µl des Überstandes mit 200µl kaltem, 96% Ethanol versetzt. Die Plasmid-DNA wurde durch eine 15minütige Zentrifugation bei 13.000rpm gesammelt (Kühlzentrifuge Sigma 2K 15). Anschließend wurde sie in 20µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst. Um weitere Analysen mit der isolierten Plasmid-DNA durchführen zu können, bedurfte es einer Amplifikation in *E.coli*-Zellen. Daher wurden von der erhaltenen Plasmid-

DNA 10µl für eine *E.coli*-Transformation eingesetzt. Nach erneuter „Minipräparation“ lag genügend DNA für die weitere Bearbeitung vor.

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

Die Isolierung von chromosomaler DNA von *S.cerevisiae* erfolgte in Anlehnung an die von Adams *et al.* (1997) entwickelte Methode. 5ml Zellkultur wurden in selektivem Medium über Nacht angezogen und abzentrifugiert (5min, 5.000rpm, Heraeus Megafuge 1.0). Die Zellen wurden in 400µl Sphäroplastenpuffer (0,5M Sorbit, 0,1M EDTA, 14mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert und 10µl einer Zymolyaselösung 100T (Stammlösung: 2,5mg/ml) zugegeben. Durch eine einstündige Inkubation bei 37°C wurde nun die Zellwand abgebaut. Die so erhaltenen Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (4°C, 13.000rpm, 5min Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) und in 0,5ml EDTA (50mM, pH 8,0) und 50µl 10% SDS resuspendiert. Durch Inkubation für 30min bei 65°C wurden DNasen inaktiviert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 150µl 5M Kaliumacetat wurden die Proben für 30min auf Eis gestellt. Die so ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (13.000rpm, 10min, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol versetzt und somit die DNA ausgefällt. Durch erneute Zentrifugation (13.000rpm, 10min, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) wurde im Pellet die DNA erhalten. Diese wurde mit 100µl RNase A-Lösung (50mM Tris/HCl, pH8, 10mM EDTA, 0,1mg/ml RNase A, 150mM Natriumchlorid) versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von Natriumacetat in einer Endkonzentration von 0,3M und 2,5 Volumenteilen Ethanol wurde erneut die DNA ausgefällt und durch Zentrifugation (13.000rpm, 10min, Kühlzentrifuge Sigma 2K 15) pelletiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 100µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.5.4 Isolierung von Nukleinsäure-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Um spezifische DNA-Fragmente nach einer Restriktion zu isolieren, wurden die gewünschten Fragmente nach elektrophoretischer Trennung in einem 0,8-1%igen Agarose-Gel unter einer UV-Lampe ausgeschnitten ( $\lambda=312\text{nm}$ ). Die Isolierung erfolgte entweder mit Hilfe des "Prep-A-Gene<sup>®</sup> DNA Purification Kits" der Firma BIO-RAD (München) oder dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche (Mannheim), jeweils nach den Anweisungen des Herstellers.

### 2.2.5.5 Reinigung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### 2.2.5.6 Restriktion von Nukleinsäuren

Die sequenzspezifische Spaltung von Nukleinsäuren erfolgte nach Anweisungen des Herstellers. Für Plasmid-DNA wurden 2U/ $\mu$ g DNA eingesetzt (Inkubationszeit: 1-2h), für chromosomale DNA (5-10 $\mu$ g) 10U Enzym (Inkubationszeit 14-16h).

### 2.2.5.7 Dephosphorylierung von Nukleinsäure-Fragmenten

Die Dephosphorylierung diente der Verhinderung von Religationen bei Vektoren, die nur mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten wurden und in die ein weiteres Fragment kloniert werden sollte. Bei der Dephosphorylierung wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen aus doppelsträngigen, linearen DNA-Fragmenten entfernt. Die Dephosphorylierung wurde mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf intestine phosphatase) nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Um nach abgeschlossener Reaktion das Enzym zu inaktivieren, 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.

### 2.2.5.8 DNA-Ligation

Die Ligation von DNA erfolgte mit einem 5molaren Überschuß an Fragment-DNA gegenüber Vektor-DNA 2-3h bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 16°C mit 1U T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim). Die Reaktion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.5.9 Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten mit Hilfe von Gelelektrophoresen

#### 2.2.5.9.1 Auftrennung in nativen Agarose-Gelen

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte über eine elektrophoretische Auftrennung in Agarose-Gelen. Je nach Trennbereich, der betrachtet werden sollte, wurden 0,8-1%ige Agarose-Gele verwendet (Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst). Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer (40mM Tris/HCl pH8,0 , 20mM Natriumacetat, 2mM EDTA). Um eine Längenabschätzung durchführen zu können, wurde DNA des Bakteriophagen  $\lambda$  (geschnitten mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI/HindIII* oder *HindIII*) benutzt. Durch eine Konzentration von 0,5 $\mu$ g/ml Ethidiumbromid im Agarose-Gel konnte die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda=366\text{nm}$ ) sichtbar gemacht werden.

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

Die Auftrennung der durch die Sequenzreaktionen gebildeten DNA-Fragmente erfolgte in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen. In einem Lösungsgemisch, bestehend aus 12ml Sequenziergelkonzentrat (38% Acrylamid, 2% Bisacrylamid), 33ml 8M Harnstoff-Lösung, 5ml 10x TBE/50% Harnstoff und 120µl 25%iger APS-Lösung (Ammoniumpersulfat) wurde durch Zugabe von 60µl TEMED (N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin) die Polymerisationsreaktion gestartet. Die Elektrophorese erfolgte 2-8h bei 50W (Einlauf der Proben: 40W) in einer GibcoBRL-Kammer mit 1x TBE-Puffer (90mM Tris pH8,0, 90mM Borat, 1mM EDTA) als Laufpuffer. Nach vollendeter Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und auf einem Whatman-Papier mindestens 2h bei 80°C auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Das getrocknete Gel konnte dann zur Autoradiographie eingesetzt werden. Je nach Menge der eingebauten <sup>35</sup>S-Nukleotide wurde 1-5 Tage ein Kodak X-OMAT<sup>TM</sup>-Film exponiert.

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

Die Markierung der DNA wurde nach dem Prinzip des „random priming“ (Feinberg und Vogelstein, 1983) durchgeführt. Dabei wurde für die nicht-radioaktive Markierung der „DIG DNA Labeling and Detection Kit non radioactive“ der Firma Roche Molecular Mannheim verwendet. Die Markierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.5.11 Nachweis spezifischer Nukleinsäure-Sequenzen**

#### **2.2.5.11.1 DNA-DNA-Hybridisierung („Southern-Blot“-Analyse)**

Die zu untersuchende DNA wurde über Nacht in einem Gesamtvolumen von 100µl mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt und anschließend gefällt und in Wasser gelöst. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung in einem 1%igen Agarose-Gel wurde die DNA auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham/Braunschweig) mittels eines Kapillarblots nach Southern (1975) über Nacht übertragen. Vorher 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) gewaschen. Die übertragene DNA wurde durch Inkubation bei 80°C für 1-2h an die Membran fixiert. Die so behandelte Membran wurde dann für die Hybridisierung eingesetzt.

#### **2.2.5.11.2 Hybridisierung und Detektion**

Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit 10ml Prähybridisierungslösung/100cm<sup>2</sup> (5x SSC, 0,02% SDS, 0,1% D-Laurylsarcosin, 10% NRB2 (10g Blockierungsreagenz in 100ml NRB1 (100mM Maleinsäure, 150mM Natriumchlorid, pH 7,5) gelöst)) in einer Tüte



eingeschweißt und für mindestens 1h im Wasserbad bei 68°C inkubiert. Nach Zugabe der denaturierten, markierten Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei gleicher Temperatur. Nach der Hybridisierung wurde die Membran wie folgt gewaschen: 2x 5min in 2x SSC mit 0,1% SDS bei Raumtemperatur, 2x 15min in 0,1x SSC mit 0,1% SDS bei 68°C. Der Nachweis wurde nach dem modifizierten Detektionsprotokoll der Firma Boehringer mit Maleinsäure-Puffer durchgeführt. Als Chemilumineszenz-Substrat diente CSPD® (Tropix) in einer 1:200 Verdünnung. Um die DNA sichtbar zu machen, erfolgte eine Exposition der Membran auf Röntgenfilm (Fuji RX oder Kodak X-OMAT™).

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

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des „Sequenase Version 2.0 Sequencing Kits“ (USB/Bad Homburg) durchgeführt. Die Sequenzreaktion erfolgte gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Als radioaktives Nukleotid wurde [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP eingesetzt.

#### **2.2.5.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA aus Abschnitt 3.4**

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide der Transposongenbank erfolgte durch die Firma SeqLab (Göttingen).

#### **2.2.5.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden alle mit dem „Expand™ High Fidelity PCR System“ der Firma Roche Molecular Mannheim durchgeführt. Lediglich der verwendete dNTP-Mix (jeweils 1,25mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP) entstammte nicht diesem System, sondern wurde aus Lösungen der einzelnen Nukleotide (100mM, Roche Molecular Mannheim) hergestellt. Der Standard-Ansatz enthielt eine MgCl<sub>2</sub>-Konzentration von 3mM, eine Oligonukleotid-Konzentration von 0,3 pmol/μl und eine dNTP-Konzentration von 250μM. Das verwendete PCR-Programm wurde jeweils dem zu amplifizierenden Fragment angepaßt. Zuerst erfolgte eine 5minütige Denaturierung. Erst anschließend wurde die „High fidelity“-Polymerase zugegeben. Dann folgte die eigentliche Amplifikation, die sich aus 25-35 Zyklen zusammensetzte. Diese bestand aus 45sec Denaturierung bei 96°C, dann, mit einer Zeit in Abhängigkeit von der Länge und Sequenz der Oligonukleotide, die Anlagerung der Oligonukleotide an die Ziel-DNA bei 55-60°C (Standard 2 min.). Die Zeit der Verlängerung beim dritten Schritt richtete sich nach der zu erwartenden Fragmentgröße (1min/1kb zu synthetisierende DNA). Dieser Schritt wurde bei einer Temperatur von 68°C durchgeführt. Der abschließende Verlängerungsschritt von 15min bei 68°C diente dem Auffüllen aller Doppelstränge auf die volle Länge.

### **2.2.5.15 *In vitro* Mutagenese von DNA Fragmenten**

Die *in vitro*-Mutagenese von DNA Fragmenten wurde nach der auf PCR-basierenden Methode von Boles und Miosga (1995) durchgeführt.

## **2.2.5 Analyse von Proteinen**

### **2.2.5.1 Herstellung von *S. cerevisiae*-Rohextrakten**

Die Präparation von Rohextrakten erfolgte aus 50-500ml Flüssigkultur. Nach dem Ernten der Zellen (5min, 3000rpm, Heraeus Megafuge 1.0) wurden diese zweimal mit dem jeweiligen Puffer gewaschen. Für den Aufschluß wurden die Zellen in 1ml des gleichen Puffers, resuspendiert, mit 0,5g Glasperlen ( $\varnothing = 0,45 - 0,5\text{mm}$ ) versetzt und 8min bei 4°C auf dem IKA-Vibrax-VXR aufgeschlossen.

### **2.2.5.2 Herstellung von *E. coli*-Rohextrakten**

Die Präparation von Rohextrakten erfolgte aus 50-500ml Flüssigkultur. Nach dem Ernten der Zellen (10min, 10.000rpm, Beckman) wurden diese zweimal mit dem jeweiligen Puffer gewaschen. Für den Aufschluß wurden die Zellen in 1ml des gleichen Puffers, resuspendiert, mit 0,5g Glasperlen ( $\varnothing = 0,11\text{mm}$ ) versetzt und 8min bei 4°C auf dem IKA-Vibrax-VXR aufgeschlossen.

### **2.2.5.3 Bestimmung des Proteingehaltes**

Proteinkonzentrationen wurden je nach Anzahl der Proben und zu erwartender Proteinkonzentration mit unterschiedlichen Methoden bestimmt.

#### **2.2.5.3.1 Proteinbestimmung nach der Micro-Biuret-Methode**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Rohextrakten für die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität erfolgte mit Hilfe der Micro-Biuret-Methode (Zamenhof, 1957). Ein Aliquot des zu messenden Rohextraktes wurde mit sterilem, destilliertem H<sub>2</sub>O auf 1ml aufgefüllt und mit 500 $\mu$ l Micro-Biuret-Lösung (40% NaOH, 1% CuSO<sub>4</sub>) gemischt. Nach einer Inkubation von 10-60min wurde die Extinktion in einem Photometer (Pharmacia, Ultrospec 4000) bei 290nm gemessen. Zur Eichung diente Rinderserum-Albumin.

### **2.2.5.3.1 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode**

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen für den Nachweis der Phosphorylierung von Mpk1p wurde das Verfahren nach Bradford (1976) angewendet. Dazu diente der "Protein Assay" der Firma BIO-RAD (München), der nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 595nm in einem Pharmacia, Ultrospec 4000 Photometer. Als Standard wurde eine Eichkurve mit Rinderserum-Albumin (BSA) aufgenommen.

### **2.2.5.4 Nachweis und Bestimmung enzymatischer Aktivität**

#### **2.2.5.4.1 Qualitativer Nachweis der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität durch Überschichten**

Für eine grobe Abschätzung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in *S. cerevisiae*-Zellen, wurden diese zunächst über Nacht auf Agarplatten angezogen. Zum Überschichten der Platten wurden 10ml 1% Agarose (in H<sub>2</sub>O gelöst) und 10ml 1M Natrium-Phosphat-Puffer, pH7,0 getrennt in der Mikrowelle erhitzt. Die Lösungen wurden auf etwa 50°C abgekühlt, gemischt und zusätzlich mit 50 $\mu$ l 10%iger SDS-Lösung und 400 $\mu$ l X-Gal-Lösung (5mg/ml in Dimethylformamid gelöst) versetzt. Pro Platte wurden ca. 20ml dieses Gemischs zum Überschichten verwendet. Die Platten wurden nach dem Überschichten noch für 1h - 5h (längstenfalls über Nacht) bei 30°C inkubiert.

#### **2.2.5.4.2 Quantitativer Nachweis der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität**

Zur Bestimmung von  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten in Rohextrakten wurden je 950 $\mu$ l 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 (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid), pH7,0) mit 50 $\mu$ l Rohextrakt vermischt und bei 30°C bis zur Gelbfärbung inkubiert. Die Reaktion wurde dann durch die Zugabe von 500 $\mu$ l 1M Natriumcarbonat-Lösung gestoppt, wobei die Extinktion 1,0 nicht überschreiten sollte. Die Proben wurden dann bei 420nm in einem Ultrospec 4000/UV/Visible Spectrophotometer der Firma Pharmacia Biotech gemessen.

Die spezifische Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

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

$\Delta E/\text{min}$  : Extinktionsänderung pro Minute

$\varepsilon$  : Extinktionskoeffizient (für 2-Nitrophenol:  $\varepsilon = 4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$V_{\text{ges}}$  : Gesamtvolumen des Testansatzes in der Küvette (in 1500 $\mu\text{l}$ )

$V_{\text{RE}}$  : Volumen des eingesetzten Rohextraktes (in  $\mu\text{l}$ )

$d$  : Schichtdicke der Küvette (1cm)

$m_{\text{Prot}}$  : Proteinkonzentration des Rohextraktes (mg/ml)

#### **2.2.5.4.3 In vitro-Nachweis der Pkc1p-Enzymaktivität**

##### ***Herstellung der Rohextrakte***

Die Hefezellen wurden in 50 ml synthetischem Medium ohne Leucin, angezogen. Die Zellen wurden geerntet und in 1% des Ausgangsvolumens Lysispuffer (50mM HEPES pH7,5, 150 mM KCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 100 $\mu\text{g/ml}$  PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$  Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin, Benzamidin, Trypsin Inhibitor, 0,03% Octyl  $\beta$ -Glucoside, 10% Glycerin) resuspendiert. 2 $\mu\text{l}$  Antifoam A und 0,5 Volumen Glasperlen ( $\varnothing = 0,45 - 0,5\text{mm}$ ) wurden hinzugefügt, bevor die Zellen auf einem IKA Vibrax VXR bei 4°C aufgeschlossen wurden. Der Überstand wurde für 10 min. bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, die Proteinkonzentration wurde bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.5.3.1) und auf 5mg/ml eingestellt. Der Rohextrakt wurde vorsichtig für 1h bei 4°C geschüttelt, um die Löslichkeit von Pkc1p zu erhöhen. Anschließend wurden die Rohextrakte für 1h bei 100.000g zentrifugiert.

##### ***Immunkomplexfällung***

200 $\mu\text{g}$  Protein wurden zu einem Endvolumen von 500 $\mu\text{l}$  Immunpräzipitationspuffer (50mM Tris-HCl, pH7,5; 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 0,25% Gelatine, 10 $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, 1% Nonidet P-40) gegeben. 1 $\mu\text{g}$  monoklonaler Maus-anti-*c-myc*-Antikörper (Calbiochem) und 50 $\mu\text{l}$  Protein G-„MicroBeads“ (Miltenyi Biotec) wurden zugegeben, gemischt und für 30 min bei 4°C inkubiert. „ $\mu$  Columns“ (Miltenyi Biotec) wurden in den Separator gegeben und mit 200 $\mu\text{l}$  Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Die Mixtur aus Lysat, Antikörpern und „MicroBeads“ wurde auf die Säule gegeben. Anschließend wurden diese viermal mit 200 $\mu\text{l}$  Immunpräzipitationspuffer und einmal with 40 mM MOPS pH7,5 gewaschen. Die Säulen wurden durch Waschen mit 200 $\mu\text{l}$  Reaktionsmix (40 mM MOPS, pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM Dithiothreitol) auf die enzymatische Reaktion vorbereitet.

### ***Kinasereaktion***

Zur Bestimmung der *in vitro*-Kinaseaktivität wurden 25µl Reaktionsmix (s.o.) mit 50 µM [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP und 0,2 mg/ml eines synthetischen Substratpeptides (Sequenz: LKRGNSKRVSSTAADC aus dem Zielprotein Bck1p, welches von Pkc1p *in vivo* phosphoryliert wird) versetzt und auf die Säule gegeben. Dann wurde die Säule für 30 min bei 30°C inkubiert. Das Substrat wurde anschließend durch Zugabe von 25µl heißem Laemmli-Probenpuffer (25ml 4xSammelgelpuffer; 39ml 10%ige SDS-Lösung, 20ml Glycerin, 10ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, 4mg Bromphenolblau, H<sub>2</sub>O ad 100ml; Laemmli, 1970) eluiert.

### ***Auftrennung und Nachweis***

Die Proben wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.2.5.5.1). Nach der Elektrophorese wurden das Gel einmal für 10 min in 12,5% Trichlooessigsäure und zweimal mit 10% Methanol, 10% Essigsäure gewaschen. Anschließend wurde das Gel auf 3MM Whatman Chromatographie-Papier auf einem Gelrockner getrocknet. Zuletzt wurde ein Kodak X-OMAT<sup>TM</sup> Film benutzt, um die Phosphorylierung des Proteins nachzuweisen. Die Expositionszeit betrug je nach Stärke des Signals 1-7 Tage.

## **2.2.5.5 Nachweis spezifischer Proteine**

### ***2.2.5.5.1 Auftrennung von Proteinen mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese***

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelen wie von Laemmli (1970) beschrieben. Es wurden 3%ige Sammelgele, 7,5%ige Gele für den Nachweis von Pkc1p und 10%ige Gele für die Elektrophorese bei der Aufreinigung von Rho1p (Abschnitt 3.2.3.3) und der HR1-Domäne (Abschnitt 3.2.3.4) eingesetzt.

### ***2.2.5.5.2 Transfer von Proteinen auf Membranen***

Der Transfer der Proteine erfolgte entweder in einer "Tankblot-Apparatur" auf eine Membran (Protan BA Nitrocellulose-Membran; zum Nachweis von Mpk1p und phosphoryliertem Mpk1p) oder mit Hilfe einer Elektroblob-Apparatur (BIO-RAD, München) auf Immobilon P-Membran (zum Nachweis der anderen Proteine), die gemäß den Angaben des Herstellers vorbehandelt wurde. Die Übertragung wurde in Transfer-Puffer (25mM Tris, 192mM Glycin, 20% Methanol) durchgeführt. Dabei wurde für die erste Methode 4h bei 4°C bei 55V, für die zweite Methode 20 min. bei 4°C und 400mA übertragen. Die Membranen wurden mit Waschpuffer mit 5% Rinderserumalbumin (100ml 10x PBS, 1ml Tween-20, H<sub>2</sub>O ad 1000ml; 10x PBS: 0,58M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,17M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O, 0,68M NaCl) für 1 h blockiert.

### **2.2.5.5.3 Nachweisreaktionen**

#### ***Nachweis membrangebundener Proteine***

Als Erstantikörper für den Nachweis spezifischer Proteine dienten die in Tabelle 2.1 angegebenen Antikörper in den vom Hersteller angegebenen Verdünnungen in Waschpuffer (s.o.) mit 5% Rinderserumalbumin. Die Membranen wurden für 1h mit der Antikörperlösung inkubiert. Wenn mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Zweitantikörper verwendet wurden, wurde anschließend dreimal für 15 min mit Waschpuffer, der beim dritten Waschschrift erneut mit 5% Rinderserumalbumin versetzt war, gewaschen. Die verwendeten Zweitantikörper finden sich erneut in Tabelle 2.1. Die Membran wurde dreimal mit Waschpuffer für jeweils 15min gewaschen. Dann wurde die Membran 15min in Substratpuffer (10mM Tris/HCl pH9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>) äquilibriert. Die Färbelösung enthielt 4mg NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsals) und 1,7mg BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) in 10ml Substratpuffer. Die Färbereaktion wurde durch Waschen der Membran mit destilliertem Wasser beendet. Wenn mit Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper verwendet wurden, kam ein Chemilumineszenzsubstrat (Pierce) zum Einsatz. In diesem Fall wurden die Waschschriffe nach den Anweisungen des Herstellers abgeändert.

#### ***Nachweis von Proteinen mit „Coomassie Brillant Blue“***

Zur Färbung von Proteinen mit „Coomassie Brillant Blue“ wurden die Gele 1h in 0,1% „Coomassie Brillant Blue“ (Merck), 7,5% Acetat und 50% Methanol bei 65°C inkubiert und anschließend für 1h bei 65°C in 7,5% Acetat und 20% Methanol entfärbt.

#### ***Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung***

Der Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung erfolgte nach der Methode von Blum *et al.* (1987). Dazu wurde das Gel für eine Stunde in 50% Methanol, 12% Essigsäure und 0,5ml/l Formaldehyd geschüttelt, danach dreimal für 20 min in 50% Ethanol gewaschen und für 1 min 0,2g/l Natriumthiosulfat geschwenkt. Anschließend folgten erneut drei kurze Waschschriffe für jeweils 20 Sekunden in deionisiertem Wasser, eine 20 minütige Inkubation in 2 g/l Silbernitrat und 0,75 ml/l Formaldehyd und erneutes Waschen für zweimal zwanzig Sekunden in deionisiertem Wasser. Die Farbreaktion wird mit 60g/l Dinatrium-Carbonat, 0,8mg/ml Natriumthiosulfat und 0,5 ml/l Formaldehyd gestartet und nach ungefähr einer Minute (oder bei großen Proteinmengen auch kürzer) mit 50% Methanol, 12% Essigsäure gestoppt.

#### **2.2.5.5.4 Affinitätsreinigung markierter Proteines mittels Ni-NTA Agarose**

Zur Aufreinigung des mit sechs Histidinresten markierten Rho1p wurde Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Als Expressionstamm wurde der *E. coli*-SURE-Stamm der Firma Stratagene (La Jolla, Kalifornien) eingesetzt. Der Test der Expression und die Aufreinigung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers für nicht-denaturierende Aufreinigung von Proteinen im kleinen Maßstab.

#### **2.2.5.5.5 Affinitätsreinigung markierter Proteines mittels Glutathion-Sepharose**

Für die Aufreinigung der mit Glutathion-S-Transferase markierten HR1 Domäne aus Pkc1p wurden 300µl Rohextrakt mit 50µl 1x PBS-äquilibrierter Glutathion-Sepharose versetzt und für 1h bei 4°C auf einer „Wippe“ inkubiert. Die Matrix wurde dann 3 mal mit 500µl 1x PBS-Puffer (s.o.) gewaschen und dreimal mit 50µl Elutionspuffer (50mM Tris/HCl, pH8,0, 10mM reduziertes Glutathion) inkubiert. Der Überstand der Elution wurde abgenommen und vereinigt, 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer (25ml 4xSammelgelpuffer; 39ml 10%ige SDS-Lösung, 20ml Glycerin, 10ml β-Mercaptoethanol, 4mg Bromphenolblau, H<sub>2</sub>O ad 100ml; Laemmli, 1970) versetzt, 10 min gekocht und mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte entweder mit gegen Glutathion-S-Transferase gerichteten Antikörpern oder mit Hilfe einer Silberfärbung.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Untersuchungen an der „Cystein-reichen“ Domäne

#### 3.1.1 Weiterführende Untersuchungen an der C1 C<sub>434, 437</sub>S/C<sub>514,517</sub>S Mutanten

In einer vorhergehenden Arbeit wurde bereits eine Mutante in der Cystein-reichen Region von *PKCI* erzeugt und phänotypisch charakterisiert (Jacoby *et al.*, 1997). Die Mutationen zielten in erster Linie darauf ab die Zinkfinger-Struktur der C1 Domäne zu zerstören und Zellen, die ein solchermaßen verändertes Allel trugen zeigten die, für *PKCI* Mutanten unter Abschnitt 1.2.1.1 beschriebenen, typischen Wachstumsdefekte. Durch die vorangegangenen Untersuchungen ließ sich jedoch nicht klären, welcher Art die Aktivierung an der C1 Domäne ist. Es war nach wie vor nicht geklärt, ob die Bindung von DAG oder die von Kamada *et al.* (1996) und Nonaka *et al.* (1995) beschriebene Bindung der kleinen GTPase Rho1p an die C1 durch die eingeführten Mutationen unterbunden wird.

##### 3.1.1.1 Dihybrid Untersuchungen mit dem C<sub>434, 437</sub>S/C<sub>514,517</sub>S *pkc1* Allel

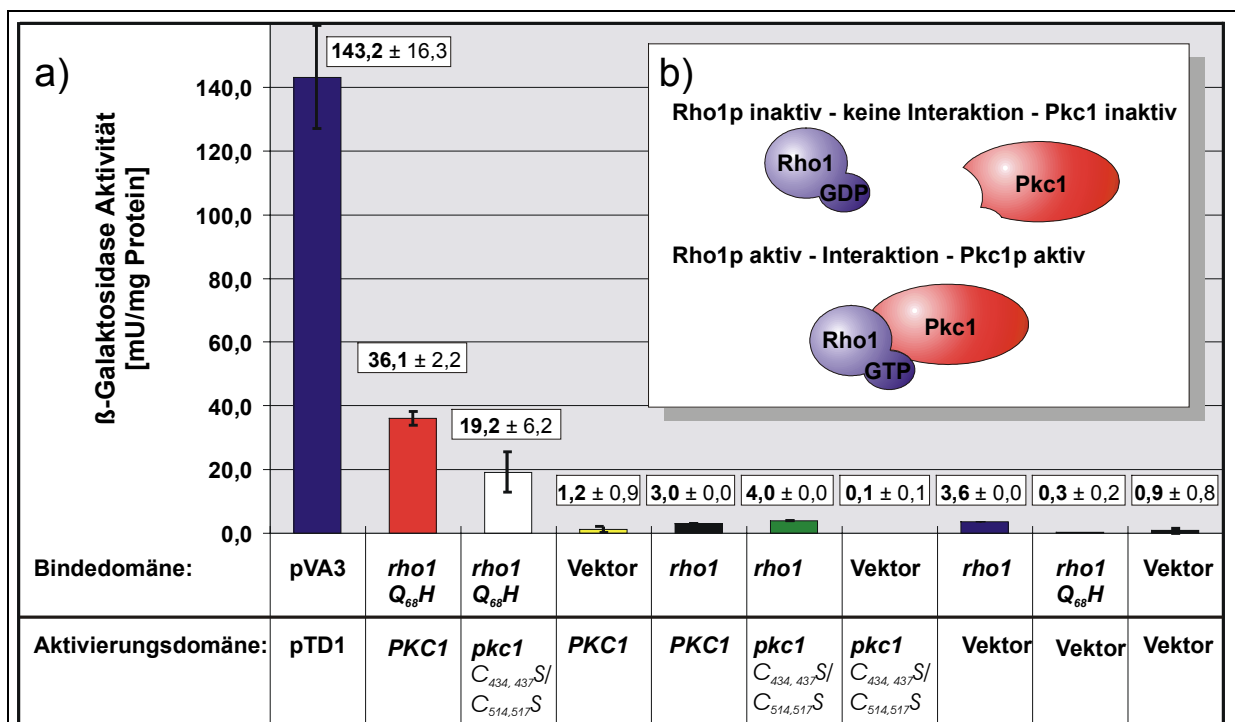
Mit Hilfe des Dihybrid Systems können Protein-Protein Wechselwirkungen *in vivo* untersucht werden (Fields und Song, 1989). Dazu wird jeweils ein Interaktionspartner an die DNA-Bindedomäne und der andere an die Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors (bei dem hier verwendeten System von *GAL4*) fusioniert. Zusätzlich besitzen beide Fusionsproteine eine Kernlokalisierungssequenz. Kommt es zur Interaktion der beiden Proteine, so bildet der Komplex einen Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Reportergenen ermöglicht. Der in dieser Arbeit eingesetzte Stamm PJ69-4A (James *et al.*, 1996) verfügt über Reporterkassetten für Wachstumselektion auf Histidinmangel- und Adeninmangel-Medium, sowie über die  $\beta$ -Galaktosidase, deren Aktivität leicht über Farbreaktionen nachgewiesen werden kann. Das *PKCI*-Gen lag bereits als Fusion mit der *GAL4* Aktivierungsdomäne vor. Die C<sub>434, 437</sub>S/C<sub>514,517</sub>S Mutation wurde über Klonierung in diesen Vektor eingebracht und resultierte in dem Vektor pHPS43.

Kamada *et al.* (1996) konnten eine Interaktion von Rho1p mit Pkc1p nur für die GTP-gebundene Form nachweisen. Aus diesem Grund finden bei Dihybrid Versuchen mit kleinen GTPasen üblicherweise Mutanten Verwendung (Nonaka *et al.*, 1995). Die eingefügten



Mutationen ändern die Konformation des Proteins derart, daß eine Hydrolyse von GTP nicht mehr möglich ist (Ihara *et al.*, 1998).

Ein weiteres Problem bei der Verwendung des Dihybrid Systems mit kleinen GTPasen ist deren C-terminale Lipidmodifikation (s. Abschnitt 1.2.1.4.1), die eine Kernlokalisierung der Proteine verhindert. Aus diesem Grund finden entweder C-terminale Deletionen (Imamura *et al.*, 1997) oder Mutationen der Erkennungssequenz für das Anbringen der Lipidmodifikation CAAX Verwendung (Schmidt *et al.*, 1997). Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde freundlicherweise von M.N. Hall ein *rho1*<sub>Q<sub>68</sub>H</sub>, C<sub>206</sub>S und ein *rho1*C<sub>206</sub>S Allel (Schmidt *et al.*, 1997) zur Verfügung gestellt, welche mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert und in den Bindedomänenvektor pGBT9 eingebracht wurden (Vektoren pHPS45 und pHPS49).



**Abbildung 3.1: Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität als Maß der Stärke der Interaktion zwischen Pkc1p und Rho1p**

a) Der Stamm PJ69-4A wurde mit den oben aufgeführten Kombinationen folgender Vektoren transformiert: pHPS45 (*rho1*), pHPS49 (*rho1*<sub>Q<sub>68</sub>H</sub>), pHPS43 (*pkc1*<sub>C<sub>434,437</sub>S/C<sub>514,517</sub>S</sub>), pGADPKC (*PKC1*), pGAD424 (Vektor) und pGBT9 (Vektor). Die Vektoren pVA3 (p53) und pTD1 (T-Antigen) dienen als Positivkontrolle. Die *rho1*-Allele codieren zusätzlich für eine C<sub>206</sub>S Mutation, um die Lipidmodifikation der Proteine zu verhindern und die Kernlokalisierung zu ermöglichen. Die Zellen wurden über Nacht in 2 ml Leucin- und Tryptophan-freiem Medium angezogen. Dann wurden erneut 3ml Medium zugefügt und die Zellen für weitere 4h bei 30°C inkubiert. Die Messung der β-Galaktosidaseaktivität erfolgte wie in Material und Methoden (Abschnitt 2.2.5.4.1) beschrieben. b) Prinzip der Aktivierung von Pkc1p durch Rho1p: Rho1p in seiner GDP-gebundenen Form kann nicht an Pkc1p binden. Die Proteinkinase wird nicht aktiviert. Liegt Rho1p jedoch in seiner GTP-gebundenen Form vor kann es Pkc1p binden und aktivieren.

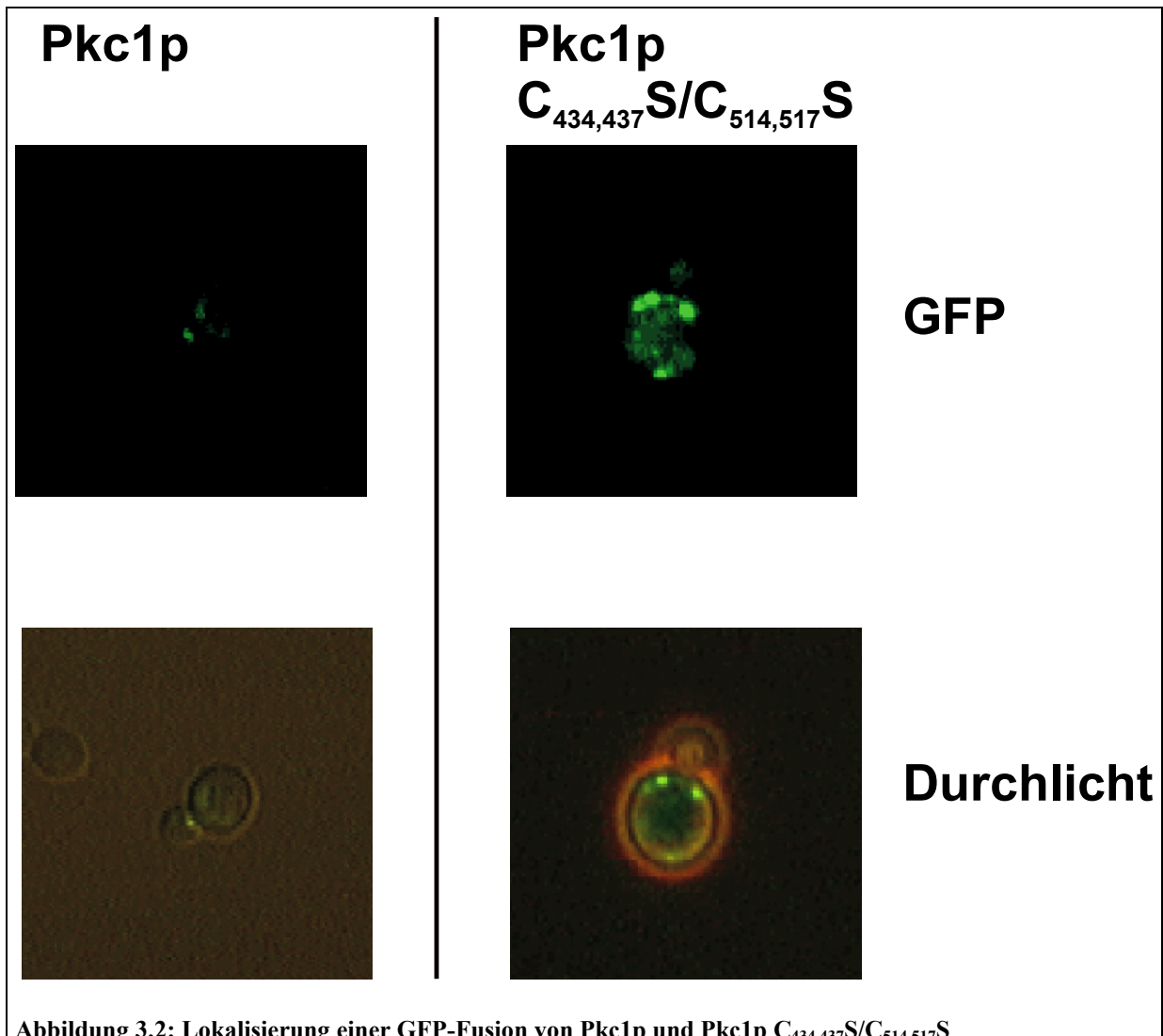
Sowohl Transformanden, die das Wildtyp-*PKC1*-Allel als auch Zellen, die das mutierte *pkc1*-Allel in Kombination mit dem daueraktiven *rho1* Gen trugen waren in der Lage auf Histidin- und Adenin-freiem Medium zu wachsen, während Zellen mit dem Wildtyp-*RHO1* sowie alle Negativ-Kontrollen dies nicht mehr vermochten. Dieses Ergebnis zeigte, daß das mutierte Pkc1-Protein nach wie vor in der Lage ist mit Rho1p zu interagieren. Zur Klärung der Frage, ob diese Interaktion genauso stark ist, wie die der Wildtyp-Proteine, wurde die Aktivität des dritten Reportergenproduktes, der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt, wodurch ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung gegeben ist. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die Messungen zeigen, daß, wie schon von Kamada *et al.* (1996) und Nonaka *et al.* (1995) beschrieben, die Bindung von Rho1p an Pkc1p GTP abhängig ist. Das Prinzip ist auch in Abb. 3.1 b dargestellt. Das Wildtyp-Rho1p zeigt in keinem Fall eine signifikant höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als die Negativ-Kontrollen. Zum anderen geht aus den Messungen hervor, daß die Interaktion des daueraktiven Rho1p Q<sub>68</sub>H Allels mit der Pkc1p-Mutante um 30-50 % herabgesetzt ist.

### 3.1.1.3 Einfluß der Pkc1p C<sub>434,437</sub>S/C<sub>514,517</sub>S Mutation auf die Lokalisierung

Die oben untersuchte Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p führt zu einer Rho1p-abhängigen Lokalisierung von Pkc1p am Ort des Aufeinandertreffens von Aktinzytoskelett und Zytoplasmamembran (Andrews und Stark, 2000). Da in den untersuchten Mutanten diese Fähigkeit zur Wechselwirkung angeschwächt ist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Pkc1p C<sub>434,437</sub>S/C<sub>514,517</sub>S-Mutation auch zu einer veränderten Lokalisierung des Proteins führt.

Zu diesem Zweck wurde das Protein C-terminal an GFP („Grün fluoreszierendes Protein“) fusioniert. Dieses Protein aus der zur Biolumineszenz fähigen Qualle *Aequora victoria* absorbiert UV-Licht mit einem Maximum von 395nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 509 Nanometern und kann deshalb als Marker für die Proteinlokalisierung genutzt werden (Chalfie *et al.*, 1994). Wie man in den Aufnahmen in Abbildung 3.2 erkennen kann, ist im Wildtyp-Pkc1p vornehmlich an den Orten polaren Wachstums, in der Knospe und an der Stelle in der Mutterzelle, an der die Knospe gebildet wurde, lokalisiert. Diese Lokalisierung stimmt mit der von Andrews und Stark (2000) publizierten Lokalisierung überein. In Zellen, die das mutierte *pkc1* Allel tragen ist ein Verlust dieser Polarität zu beobachten. Pkc1p kann in der gesamten Mutterzelle gefunden werden. Diese Lokalisierung stimmt wiederum mit der von Andrews und Stark (2000) beschriebenen Lokalisierung von Pkc1p in Zellen mit dominant negativen Allelen von *rho1* überein. Auch dieses Ergebnis

spricht für eine Beeinträchtigung der Rho1p Pkc1p-Interaktion bei Mutationen in C1. Es kann jedoch auch festgestellt werden, daß die Lokalisierung an definierten Punkten der Zellperipherie, auch in den Mutanten, nach wie vor gegeben ist. Eine mögliche Erklärung hierfür liefern die Ergebnisse in Abschnitt 3.2.



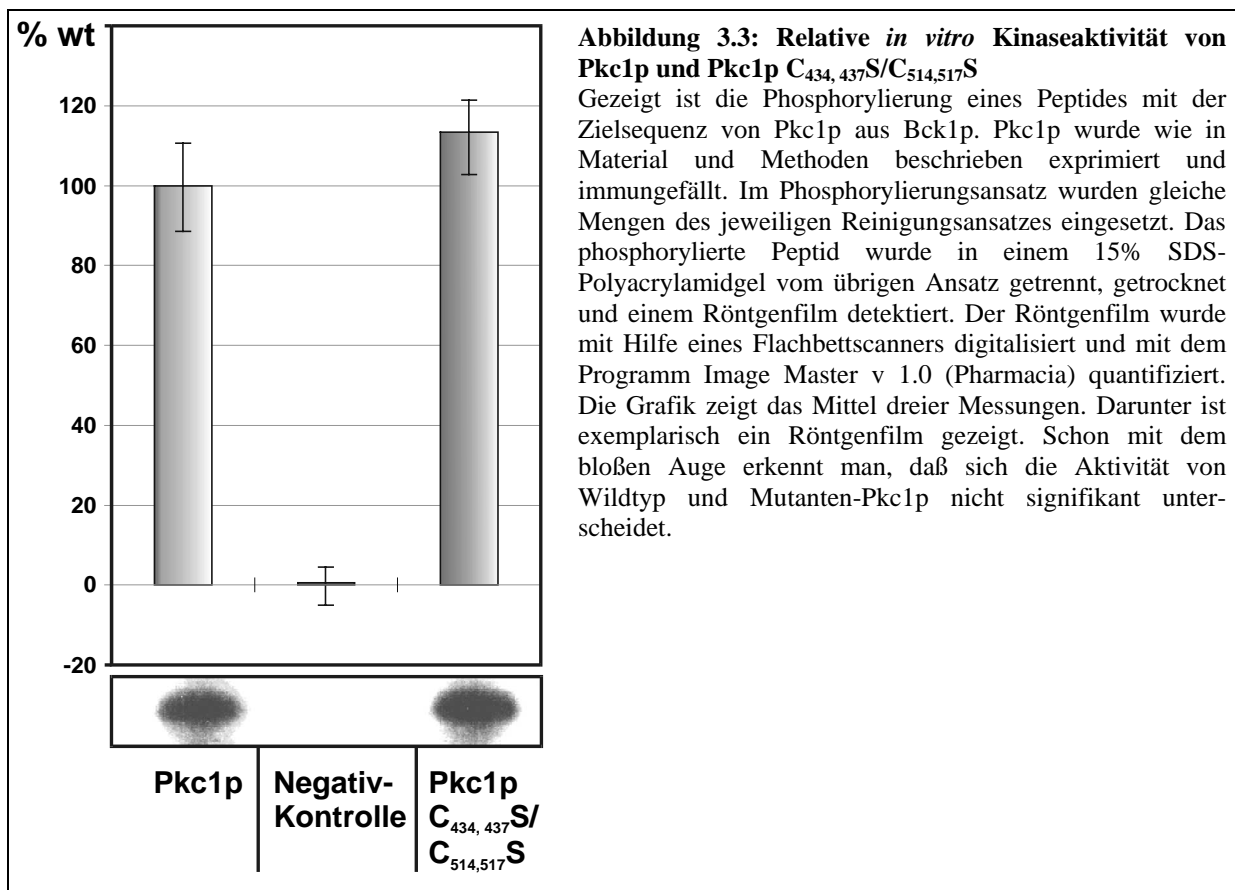
**Abbildung 3.2: Lokalisierung einer GFP-Fusion von Pkc1p und Pkc1p  $C_{434,437}S/C_{514,517}S$**

Die Vektoren pHPS90 (Pkc1p) bzw. pHPS91 (Pkc1p  $C_{434,437}S/C_{514,517}S$ ) wurden in den Stamm MCY-24A [pHPS55] transformiert. Dann wurde auf galaktosehaltigem Medium ein Plasmidverlust durch Beigabe von 5-FOA zum Medium erzwungen. Die Zellen waren in der Lage lediglich mit dem GFP-markierten Allel von *PKC1* zu wachsen, d.h. die Fusionproteine waren weiterhin funktionell. Vor der Anfertigung der Bilder wurden die Zellen über Nacht in raffinosehaltigem Medium angezogen, wodurch der vor das Gen fusionierte *GAL1/10* Promotor dereprimiert war. Durch diese Anzuchtbedingungen wurde eine für die Anfertigung der Bilder ausreichende Expression gewährleistet.

Im nächsten Teil der Arbeit stand die Fragestellung im Vordergrund, inwiefern die herabgesetzte Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p die Aktivität des Enzyms beeinflusst.

### 3.1.1.2 Bestimmung der relativen Kinaseaktivität von Pkc1p und Pkc1p C<sub>434, 437</sub>S/C<sub>514, 517</sub>S *in vitro*

*In vitro* Aktivitätsmessungen mit Pkc1p wurden bereits von Antonsson *et al.* (1994), Watanabe *et al.* (1994) und Kamada *et al.* (1996) durchgeführt. Dabei war allerdings ein Großteil des Enzymes in einem nicht näher charakterisierten Proteinkomplex gebunden und somit für eine Aufreinigung nicht zugänglich (Antonsson *et al.*, 1994). Kürzlich durchgeführte Lokalisierungsstudien zeigten, daß dieser Komplex möglicherweise die sogenannten „actin-patches“ sind (Andrews und Stark, 2000). Bei im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorversuchen zeigte sich, daß immer auch unerwünschte Proteine mit aufgereinigt werden, die auch in einer Negativkontrolle zu einer Phosphorylierung gängiger Kinase-Substrate, wie Myelin basisches Protein (MBP), führen. Dadurch wurde es notwendig ein spezifisches Substratpeptid einzusetzen, das der Sequenz aus Bck1p entspricht, die von Pkc1p erkannt und phosphoryliert wird. Dieses Peptid mit der Sequenz „LKRGN SKRVVSSTSAADC“ wurde freundlicherweise von Dietmar Becher (Greifswald) synthetisiert und zu Verfügung gestellt. Entscheidend für eine hinreichend gute Immunfällung war zudem die Wahl der verwendeten Modifikation von Pkc1p. Erst die C-terminale Fusion des Proteins mit einem *c-myc* Epitop in 13facher Wiederholung (Longtine *et al.*, 1998) führte zu der für einen Kinasetest erforderlichen Reinheit des Enzymes im Testansatz.



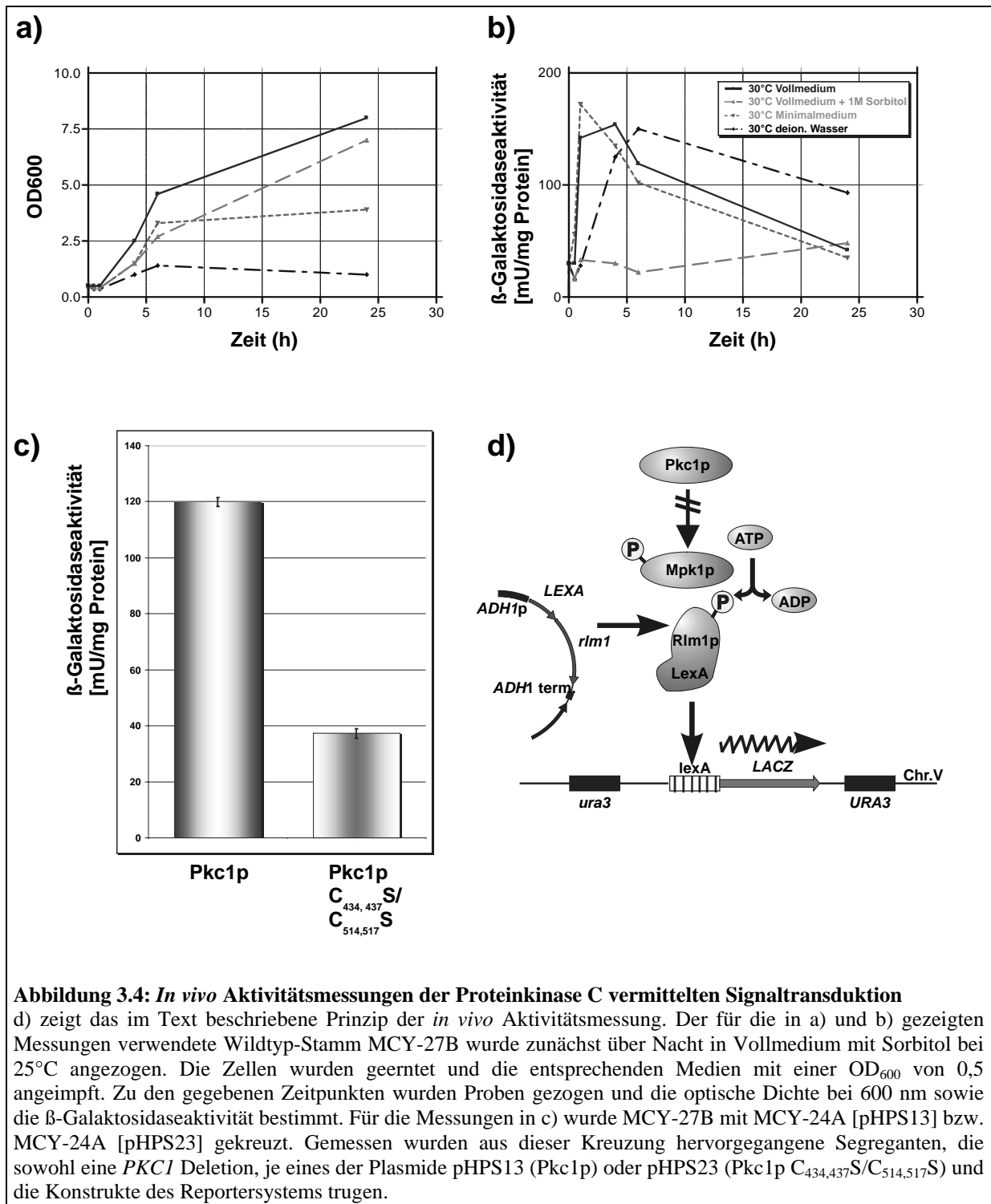
Aus Abbildung 3.3 wird ersichtlich, daß sich Wildtyp und Mutanten Pkc1p nicht signifikant in ihrer Kinaseaktivität gegenüber dem Peptid aus Bck1p unterscheidet. Dies war bei dem durchgeführten Versuch jedoch auch nicht zu erwarten, da durch die Aufreinigung von Pkc1p ein Großteil des Enzymes im inaktiven, das heißt nicht Rho1p gebundenen Zustand, vorliegen sollte. Somit wird im abgebildeten Versuch lediglich die Basalaktivität von Pkc1p gemessen. Aus den Ergebnissen kann man jedoch schließen, daß die in Pkc1p eingefügten Mutationen die Struktur nicht so zerstören, daß die Kinaseaktivität an sich betroffen ist. Es scheint tatsächlich nur eine regulatorische Funktion beeinträchtigt zu sein. Dadurch erschien es jedoch notwendig Messungen mit dem aktiviertem Enzym, das heißt in Gegenwart von Rho1p, durchzuführen. Die Versuche zur Aufreinigung von Rho1p sind in Abschnitt 3.2.3.4 beschrieben. Da zunächst eine Aufreinigung von Rho1p nicht möglich war, wurde im weiteren ein *in vivo* Ansatz zur Bestimmung der Aktivität von Pkc1p verfolgt.

### 3.1.1.3 Konstruktion eines Reporterstammes zur indirekten Messung der Aktivität von Pkc1p

Wie in der Einleitung unter 1.1 bereits beschrieben, ist die Aufgabe von Signaltransduktionswegen die Regulation der Transkription von Genen unter sich ändernden Umwelteinflüssen. Bringt man nun ein Reporter-gen, wie z.B. die schon oben erwähnte  $\beta$ -Galactosidase unter die regulatorische Kontrolle eines Signaltransduktionsweges, so verfügt man über eine einfache Methode zur Messung der Aktivität in diesem Signaltransduktionsweg. Am einfachsten lässt sich ein solches System realisieren, indem man eine Promotorfusion mit einem Gen erzeugt, das von der zu untersuchenden Signalkaskade kontrolliert wird. Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit war jedoch kein solches Gen bekannt. Aus diesem Grund wurde eine Methode gewählt die zuerst von (Watanabe *et al.*, 1997) beschrieben wurde und in Abbildung 3.4 d) dargestellt ist. Diese Methode macht sich zu Nutze, daß ein für die DNA Bindung N-terminal deletiertes Rlm1p, fusioniert an das LexA Protein aus *E. coli*, Mpk1p abhängig phosphoryliert wird. Dieses Fusionsprotein kann dann die Transkription eines Reporter-genes, welches von einem Promotor mit LexA-Bindestellen kontrolliert wird, regulieren. Zunächst wurde mit einem Wildtypstamm die Kinetik der Proteinkinase C Aktivität in verschiedenen Medien bei 30°C aufgenommen, um optimale Anzuchtbedingungen für vergleichende Messungen zu erhalten.

Aus den Messungen geht deutlich hervor, das sowohl in Minimalmedium als auch in Vollmedium der Proteinkinase C-abhängige Signaltransduktionsweg während der logarithmischen Wachstumsphase aktiviert wird. Deutlich wird zudem in allen Stämme der Rückgang der Aktivität in der stationären Phase. Dabei muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß das verwendete Reportersystem eine aktive Proteinbiosynthese voraussetzt. Diese ist jedoch in der stationären Phase weniger stark ausgeprägt als in logarithmisch wachsenden Zellen. Diese Tatsache ist auch bei Zellen zu beachten, die in Wasser inkubiert wurden. Hier ist zunächst, wie zu erwarten, ein starker Anstieg der Aktivität erkennbar, der jedoch langsamer erfolgt als in den in Medium gewachsenen Zellen. Betrachtet man die optische Dichte der Kulturen bei 600 nm als Maß für das Wachstum der Zellen, so fällt zudem ins Auge, daß die Zellen sich in Wasser nur ungefähr einmal teilen können. Der langsamere Anstieg der Aktivität ist hier womöglich darauf zurückzuführen, daß die Zellen für die Proteinbiosynthese zunächst Reservestoffe mobilisieren müssen. Lediglich das Sorbitolmedium ist durch osmotische Stabilisierung in der Lage die Aktivität des Weges nahezu auf dem Ausgangsniveau zu halten. Für die Messung der Aktivität der Mutanten

Pkc1p wurden die Zellen für 4 Stunden inkubiert und drei unterschiedliche Segreganten gemessen. Wie man sieht, beträgt die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (und damit die Aktivität im Proteinkinase C-Weg) nur noch ein Drittel der Aktivität im Wildtypstamm.



**Abbildung 3.4: In vivo Aktivitätsmessungen der Proteinkinase C vermittelten Signaltransduktion**

d) zeigt das im Text beschriebene Prinzip der *in vivo* Aktivitätsmessung. Der für die in a) und b) gezeigten Messungen verwendete Wildtyp-Stamm MCY-27B wurde zunächst über Nacht in Vollmedium mit Sorbitol bei 25°C angezogen. Die Zellen wurden geerntet und die entsprechenden Medien mit einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angeimpft. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen und die optische Dichte bei 600 nm sowie die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt. Für die Messungen in c) wurde MCY-27B mit MCY-24A [pHPS13] bzw. MCY-24A [pHPS23] gekreuzt. Gemessen wurden aus dieser Kreuzung hervorgegangene Segreganten, die sowohl eine *PKC1* Deletion, je eines der Plasmide pHPS13 (Pkc1p) oder pHPS23 (Pkc1p<sup>C<sub>434,437</sub>S/C<sub>514,517</sub>S</sup>) und die Konstrukte des Reportersystems trugen.

Die durchgeführten Versuche zeigten, daß die Pkc1p-Mutation zu einer Beeinträchtigung ausschließlich der Aktivierung des Enzymes führt. Somit scheint für diese Aktivierung in der Tat die Interaktion von Rho1p mit der C1-Domäne ausschlaggebend zu sein. Die durchgeführten Versuche schließen jedoch nicht aus, daß an der C1-Domäne noch weitere

Regulationsmechanismen greifen bzw. alternativ zu Rho1p andere Aktivatoren gebunden werden können. Dies sollte im Folgenden durch die Anfertigung weiterer Mutanten in der Cystein-reichen Region von Pkc1p näher betrachtet werden.

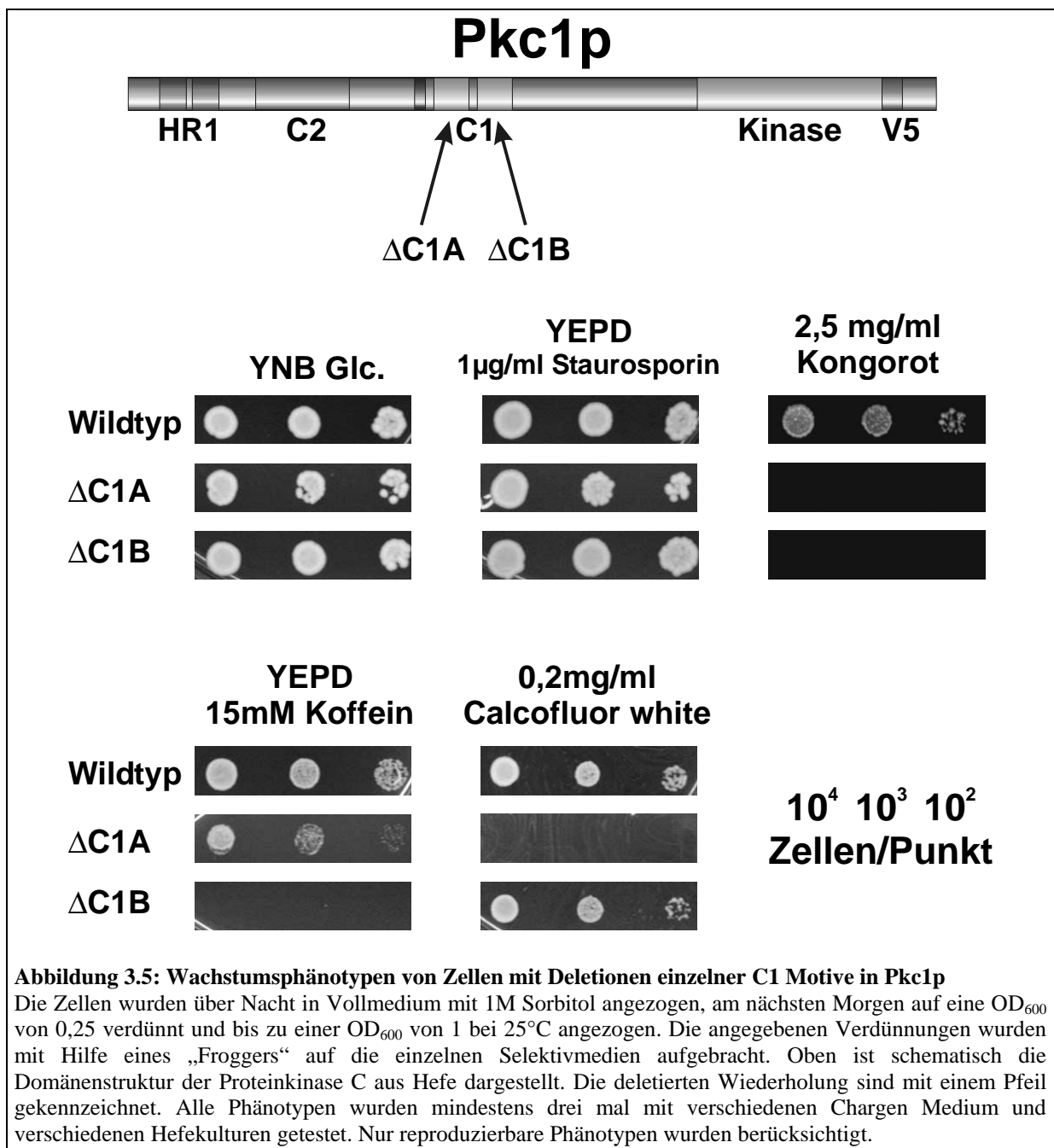
### 3.1.2 Weiterführende Untersuchungen an der C1-Domäne

#### 3.1.2.1 Deletionen in C1

Da die Cystein-reiche Region von Pkc1p aus zwei Wiederholungen des gleichen Motivs besteht (Mellor und Parker, 1998), die im allgemeinen als C1A und C1B bezeichnet werden, sollte untersucht werden, ob möglicherweise die Regulation des Enzymes über die beiden Wiederholungen unterschiedlich ist. So ist z.B. in der humanen Raf-Kinase nur eine Wiederholung des C1-Motivs vorhanden und diese ist an der Interaktion mit der kleinen GTPase Ras beteiligt (Daub *et al.*, 1998). Somit scheint für die Aktivierung durch kleine GTPasen diese einfache Wiederholung hinreichend zu sein und es stellt sich die Frage warum zwei Wiederholungen des Motivs in Pkc1p von *S. cerevisiae* zu finden sind. Es ist nicht auszuschließen, daß hier eine alternative Regulationsmöglichkeit neben der Aktivierung durch die Bindung von Rho1p besteht. Aus diesem Grund wurden zunächst Einzeldelationen von C1A und C1B angefertigt, deren *in vivo* Funktion *in vivo* zunächst durch phänotypische Charakterisierung untersucht werden sollte.

Wie schon die in 3.1.1 beschriebene Pkc1p-Mutante zeigten auch die Einzeldelationen der C1-Wiederholungen keine Wachstumsdefekte unter Standardwachstumsbedingungen bei 30°C. Auch bei der erhöhten Temperatur von 37°C waren keine Wachstumsdefekte feststellbar. Auf den getesteten Selektivmedien wurden jedoch Phänotypen sichtbar, die auch Unterschiede bei Deletion von C1A oder C1B erkennen ließen. In Abbildung 3.5 sieht man das Ergebnis von seriellen Verdünnungsreihen auf unterschiedlichen Selektivmedien. Die Stämme trugen jeweils eine genomische *pkc1::HIS3*-Deletion und wurden mit Vektoren transformiert, welche das jeweilige Mutantenallel von *pkc1* trugen.





Deutlich ist zu erkennen, daß Deletionen in C1A und Deletionen in C1B sich bezüglich ihrer Phänotypen unterscheiden. Während sowohl Wildtyp- als auch Mutantenzellen auf Medium mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin wachsen können, sind beide Mutanten nicht in der Lage auf Medium mit 2,5 mg/ml Kongorot zu wachsen. Bei Wachstum auf 15 mM Koffein ist der erste Unterschied zwischen Deletionen in C1A und C1B zu erkennen. Während erstere fast noch genauso gut wachsen können wie der Wildtyp, zeigen letztere gar kein Wachstum mehr. Das dieser Unterschied nicht einfach darauf zurückzuführen sein kann, daß in einer der Mutanten die Proteinstruktur stärker negativ beeinflusst ist, zeigt das Wachstum auf Medium mit „Calcofluor white“. Hier sind Deletionen von C1A nicht mehr in der Lage zu wachsen, während diesmal Deletionen in C1B sich wie der Wildtyp verhalten. Dieses Ergebnis deutet

---

erstmals auf einen möglichen Unterschied in der Regulation von Pkc1p an den einzelnen Wiederholungen des C1-Motives hin.

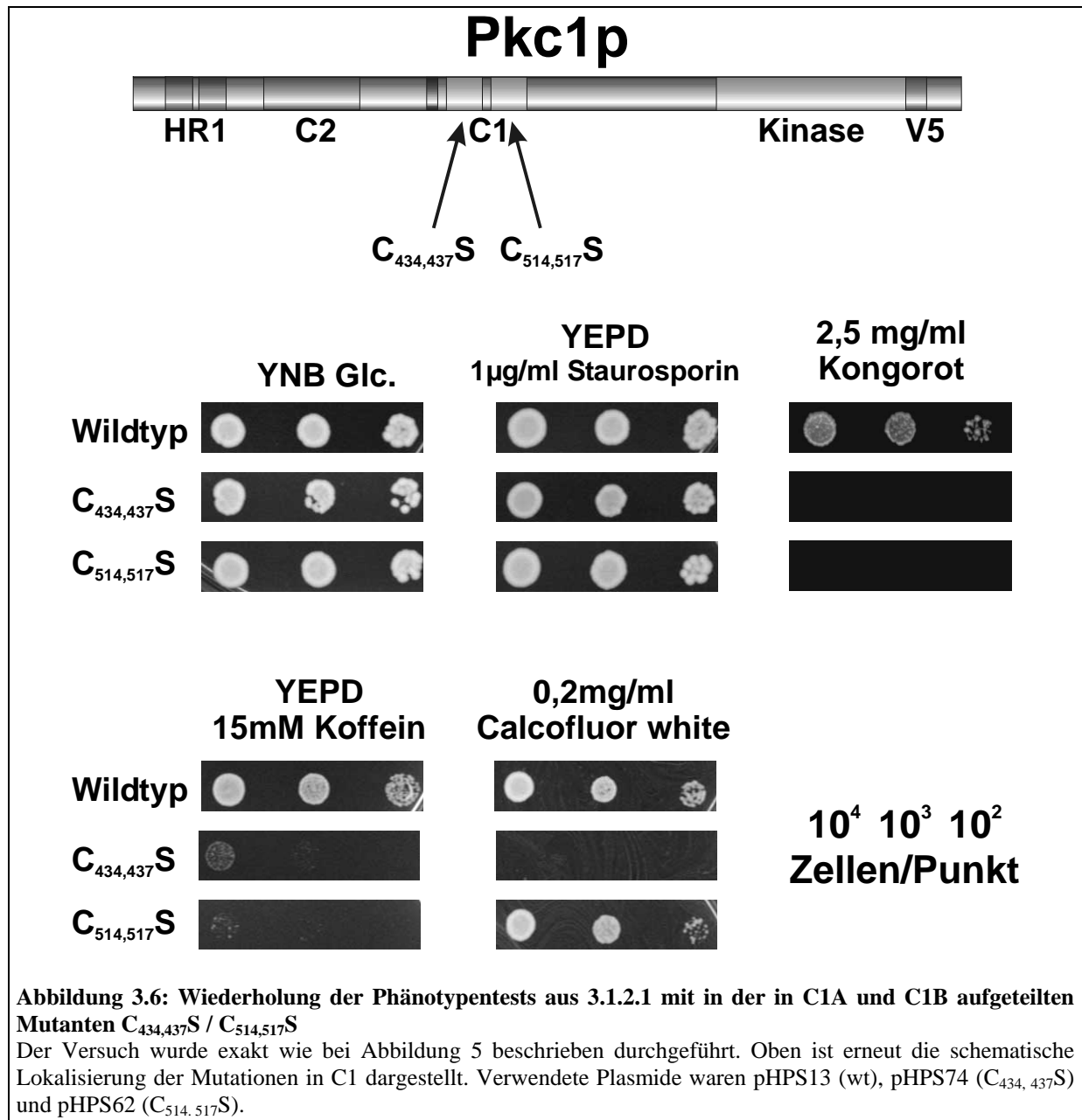
### **3.1.2.2 Untersuchungen von Punktmutationen in den C1A und C1B Wiederholungen der Cystein-reichen Region von Pkc1p**

Im Folgenden stand die Fragestellung im Vordergrund, ob der beobachtete Unterschied von Mutanten in C1A und C1B nur bei Deletion der einzelnen Domänen zu beobachten ist oder ob auch Punktmutationen in den einzelnen Domänen denselben Effekt hervorrufen.

#### **3.1.3.2.1 Getrennte Betrachtung der Doppelmutationen C<sub>434,437</sub>S / C<sub>514,517</sub>S**

Zu diesem Zweck wurde die schon unter 3.1.1 betrachtete Doppelmutante C<sub>434,437</sub>S / C<sub>514,517</sub>S (mit einem Austausch sowohl in C1A als auch in C1B) in Einzelmutanten (mit C<sub>434,437</sub>S oder C<sub>514,517</sub>S) aufgeteilt, deren Phänotypen getestet werden sollten.

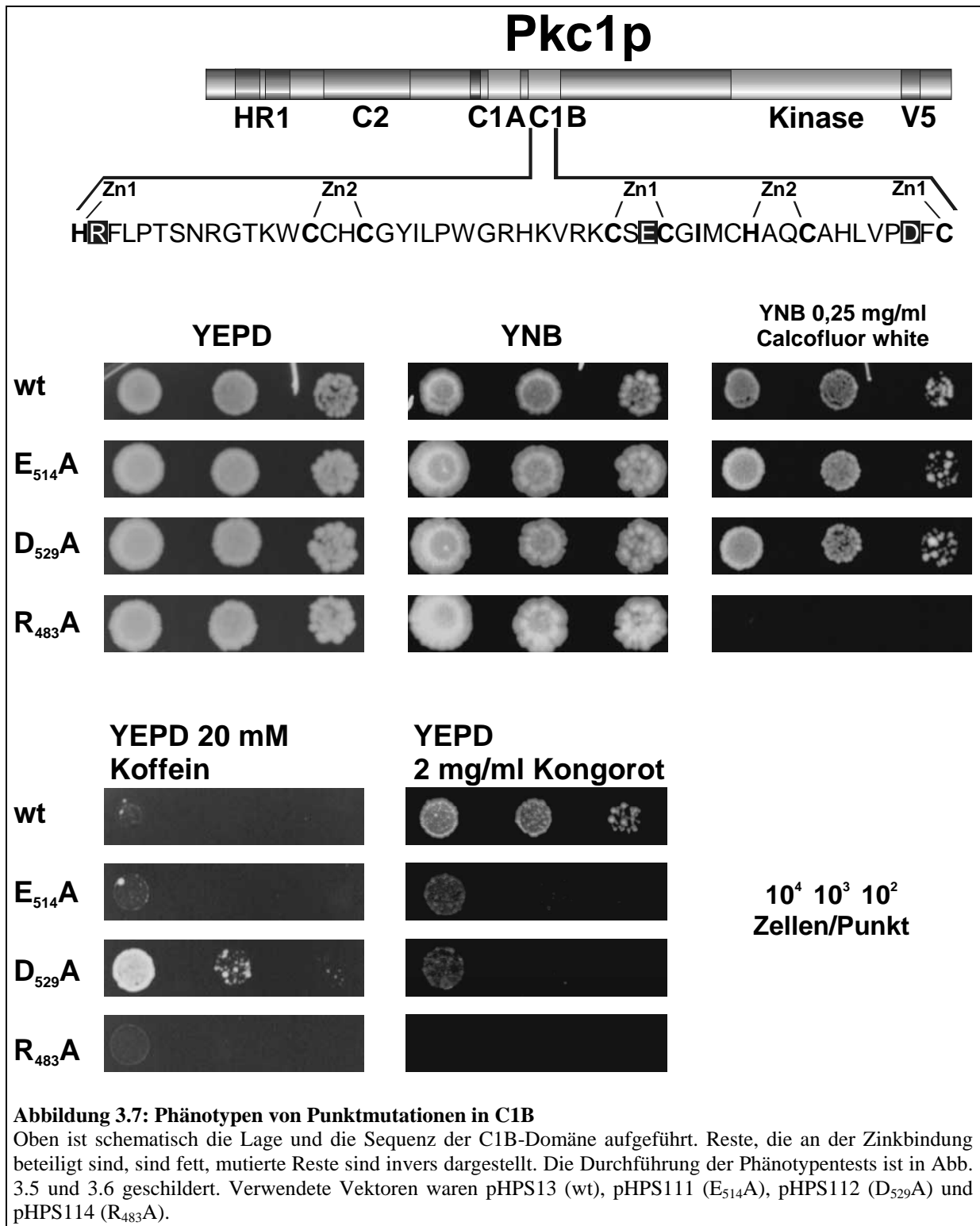
Wie schon bei den Deletionen in Abbildung 3.5 zu sehen, zeigen auch die Punktmutanten Wachstum auf Staurosporin und sind sensitiv gegenüber Kongorot. Man erkennt jedoch in Abbildung 3.6, daß auch hier die Mutante in C1A nicht mehr auf koffeinhaltigem Medium wachsen kann. Der Unterschied in der Sensitivität gegenüber „Calcofluor white“ bleibt jedoch nach wie vor bestehen. Ein Grund dafür, warum die Punktmutante im Unterschied zur Deletion auf koffeinhaltigem Medium sensitiv ist, läßt sich aus den hier durchgeführten Untersuchungen nicht ableiten. Dieses Ergebnis zeigt jedoch einmal mehr die Komplexität der Regulation an der C1-Domäne von Pkc1p aus *S. cerevisiae*.



### 3.1.3.2.2 Getrennte Betrachtung der Doppelmutationen C<sub>434,437</sub>S / C<sub>514,517</sub>S

Die in Abschnitt 3.1.2.1 und 3.1.2.2 durchgeführten Versuche erbrachten Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation an C1A und C1B. Ob möglicherweise nur eine der beiden Wiederholungen die Rho1p-Bindung vermittelt war wesentlicher Bestandteil von Untersuchungen, die von Johannes Jöckel (1999) durchgeführt wurden. Wie der Autor insbesondere durch Dihybrid- und *in vitro*-Kinasetests gezeigt hat, ist im wesentlichen die C1B-Domäne für die Interaktion mit Rho1p verantwortlich. Der Nachweis erfolgte durch das Einfügen von Mutationen in C1A und C1B, die bei C1B, nicht jedoch bei C1A zu einem Verlust der Fähigkeit zur Interaktion mit aktivem Rho1p führten. Diese Mutanten zeigten in

Kinasetests auch keine Aktivierung bei Anwesenheit von Rho1p mehr. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob entsprechende Effekte auch *in vivo* zu beobachten sind, d.h., ob die Mutationen sich auch phänotypisch ausprägen. Betrachtet man die Phänotypen in Abbildung 3.7, so fällt auf, daß die Mutation R<sub>483</sub>A den am stärksten ausgeprägten Phänotyp zeigt.



Die Zellen können weder auf „Calcofluor white“, Koffein- noch auf Kongorot-haltigem Medium wachsen. Die E<sub>514</sub>A- und die D<sub>529</sub>A-Mutanten hingegen waren nicht sensitiv

gegenüber „Calcofluor white“-haltigem Medium. Auf Koffein-haltigem Medium zeigt die D<sub>529</sub>A-Mutante sogar eine Resistenz und wächst besser als Wildtypzellen. Lediglich gegenüber Kongorot sind diese Mutanten sensitiv. Im Wesentlichen ließ sich für alle Punktmutanten wenigstens ein *PKC1*-typischer Phänotyp nachweisen, was die *in vitro*-Ergebnisse von Jöckel (1999) bestätigt. Alle bis hierher durchgeführten Studien deuten darauf hin, daß die Aktivierung von Pkc1p durch Rho1p gewährleistet wird. Auch wenn dies wohl einer der Hauptfaktoren für eine Aktivierung ist, scheint doch noch mindestens ein weiterer Faktor eine Rolle zu spielen. Wie die Ergebnisse von Jöckel (1999) und die im letzten Abschnitt durchgeführten Versuche zeigen, findet die Aktivierung von Pkc1p vornehmlich an der C1B-Wiederholung des C1-Motives statt. Da die bis hierher durchgeführten Versuche noch immer keine Aussage darüber zuließen, ob Pkc1p in *S. cerevisiae* auch durch DAG aktiviert werden kann, wurde im Folgenden Abschnitt ein anderer Ansatz gewählt, um diesen Sachverhalt zu klären.

### 3.1.2.3 Insertion der C1 von PKC $\eta$ und Raf in Pkc1p von *S. cerevisiae*

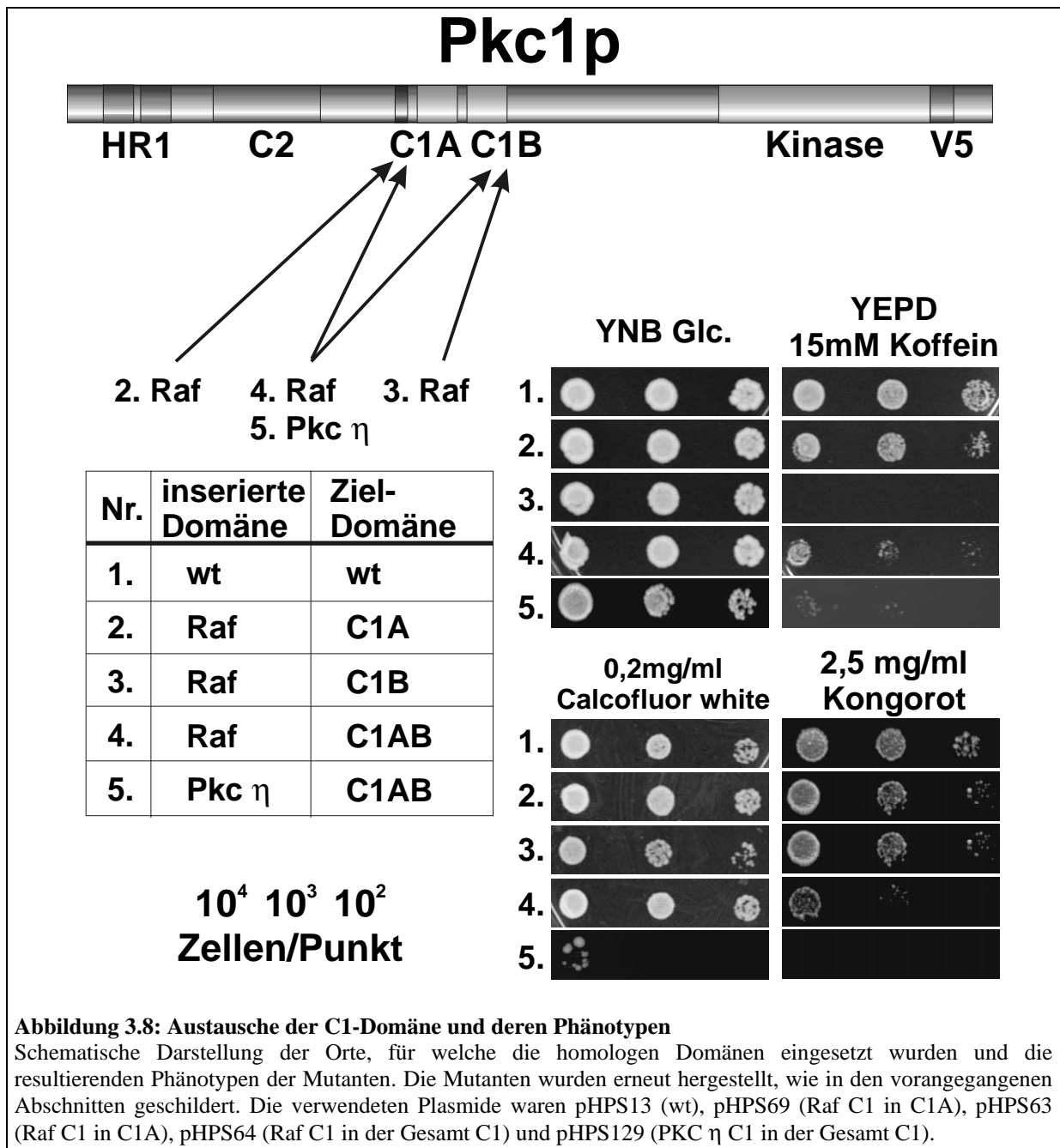
Schon in theoretischen Arbeiten wurde auf Grund von Homologievergleichen eine Einteilung von C1-Domänen in zwei Klassen vorgenommen (Hurley *et al.*, 1997). Dabei sollte die eine Klasse in der Lage sein DAG zu binden, die andere Klasse jedoch nicht. Die C1-Domäne von Pkc1p aus *S. cerevisiae* fällt dabei in die Gruppe der nicht zur Bindung von DAG befähigten Domänen. Auch läßt sich *in vitro* keine Aktivierung von Pkc1p durch DAG nachweisen (Antonsson *et al.*, 1994). Dies steht jedoch in Widerspruch zu Untersuchungen bei denen *in vivo* ein Zusammenhang zwischen einem erhöhten zellinternen Level an DAG und einer erhöhten Aktivität von Pkc1p nachgewiesen werden konnte (Marini *et al.*, 1996). Um diesen Zusammenhang zu klären, sollten in den im Folgenden Abschnitt geschilderten Untersuchungen Chimären von Pkc1p mit je einer C1 Domäne aus der DAG-bindenden und aus der nicht DAG-bindenden Gruppe hergestellt werden. Sollte eine der eingefügten Domänen in der Lage sein die C1 Domäne von Pkc1p funktionell zu ersetzen, so wäre dies ein Indiz für eine funktionelle Verwandtschaft der beiden Domänen. Sollte es gelingen einen solchen „Domänen-Ersatz“ durchzuführen wäre dies zudem eine neue Methode zur Untersuchung von verwandten Proteinen, mit der sich weitere Einteilungen nicht nur auf Homologie-, sondern auch auf funktioneller Ebene durchführen ließen.

Als Vertreter der beiden Klassen von C1-Domänen wurden C1 der humanen Raf-Kinase und C1 von PKC  $\eta$  aus Ratte gewählt. Diese bieten folgenden Vorteile: Die C1 der humanen Raf-Kinase wurde nicht nur in der oben erwähnten theoretischen Untersuchung (Hurley *et al.*, 1997) in die Klasse der nicht DAG-bindenden C1-Domänen eingeordnet, sondern sie ist genau wie die C1-Domäne von Pkc1p in *S. cerevisiae* an der Bindung und Aktivierung durch eine kleinen GTPase (das Ras-Protein) beteiligt (Daub *et al.*, 1998). Somit scheint, auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse, diese Domäne mit der aus *S. cerevisiae* funktionell die größte Verwandtschaft zu besitzen. Andererseits wurde die humane PKC  $\eta$  bei der Suche nach Proteinen gefunden, die in der Lage sind die Temperatursensitivität von Pkc1p-Mutanten in *S. cerevisiae* zu komplementieren. Da nur ein Klon der PKC  $\eta$  aus der Ratte (Dekker *et al.*, 1992) zur Verfügung stand, wurde hier dieser verwendet. Dies war für die durchgeführten Untersuchungen auch nicht von Bedeutung, da die Proteine aus Maus und Ratte zu 97 und in der hier betrachteten C1-Domäne sogar zu 100% identisch sind.

Die C1 Domäne der humanen Raf-Kinase entspricht nur einer Wiederholung des C1-Motives aus Pkc1p und PKC  $\eta$ . Aus diesem Grund wurde diese sowohl für die C1A- und C1B-Wiederholung, als auch für beide zusammen in Pkc1p eingesetzt.

### 3.1.3.3.1 Phänotypen von Mutanten mit chimären Pkc1p Enzymen

Die Phänotypen der hergestellten Mutanten sind in Abbildung 3.8 zusammengefasst.

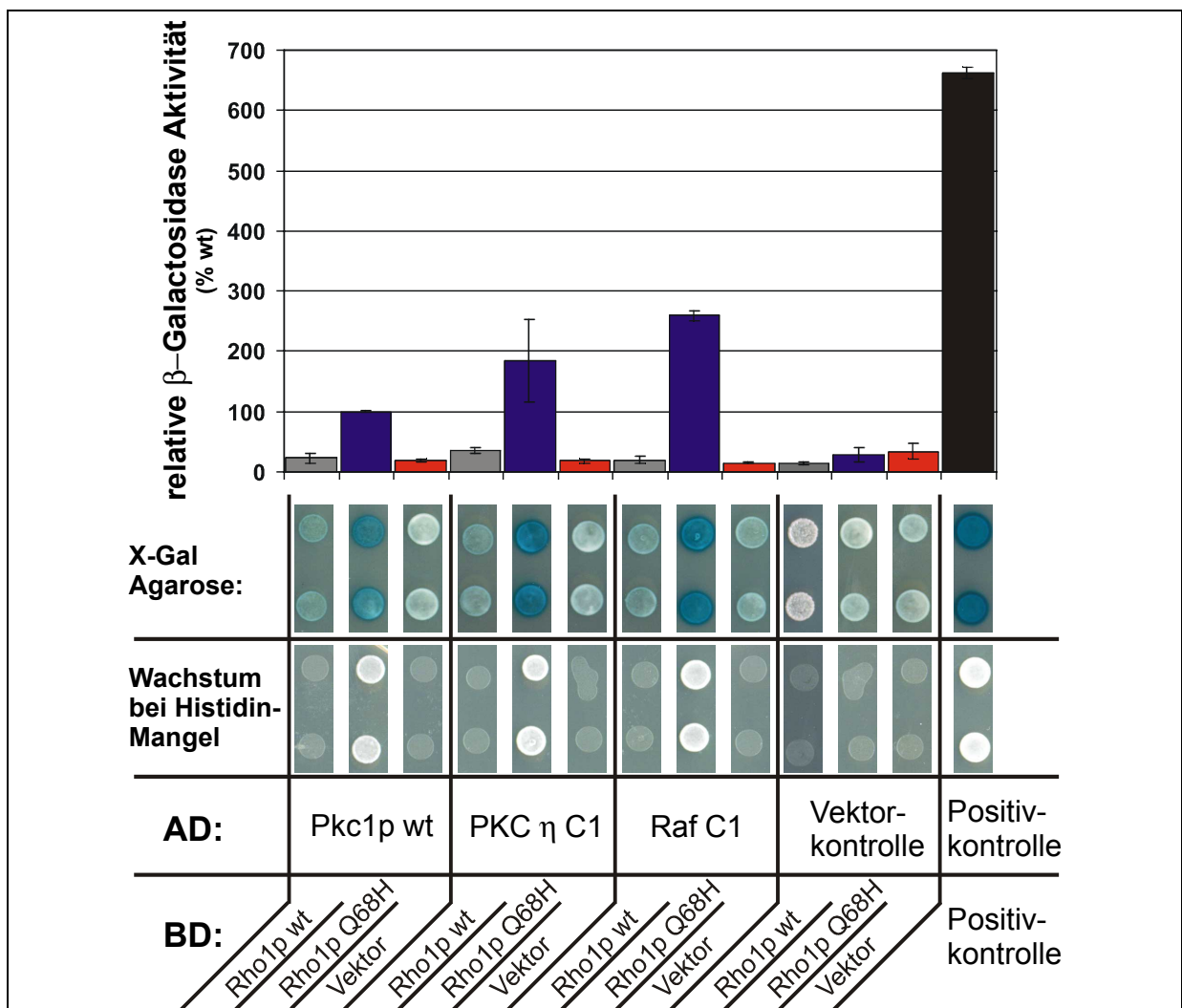


Wie man erkennen kann, zeigen die Insertionen von Raf-C1 in C1A in keinem Fall einen Wachstumsdefekt, d.h. die Funktion der C1A kann vollständig ersetzt werden. Die Insertion für C1B ist jedoch koffeinsensitiv, obwohl die Zellen auf „Calcofluor white“ und „Kongorot“-haltigem Medium wachsen können. Sogar durch das Ersetzen beider C1-Wiederholungen durch eine Raf-C1 Sequenz kann das Wachstum auf Koffein- teilweise und auf „Calcofluor white“-haltigem Medium vollständig wiederhergestellt werden. Lediglich auf

Kongorot sind diese Mutanten nicht mehr in der Lage zu wachsen. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, daß die Cystein-reiche Domäne aus der humanen Raf-Kinase in der Lage ist, die Funktion derjenigen, aus *S. cerevisiae* funktionell zu ersetzen. Anders ist das Bild bei der Insertion der Cystein-reichen Region aus PKC  $\eta$  der Ratte. Zellen, die dieses Hybridprotein tragen, können auf keinem der Selektivmedien mehr wachsen. Dies gibt Anlaß zu der Vermutung, daß die Fähigkeit von PKC  $\eta$  temperatursensitive *PKC1* Mutanten zu komplementieren mehr auf einer ähnlichen Substratspezifität als auf einer ähnlichen Regulation beruht.

### 3.1.3.3.2 „Dihybrid“-Untersuchungen mit chimären *Pkc1p* Proteinen

Die oben geschilderte Einteilung legt nahe, daß sowohl die Hefe C1 als auch die Mutante mit Raf C1 zur Bindung kleiner GTPasen befähigt sind, während die Mutante mit C1 aus PKC  $\eta$  dazu nicht in der Lage sein sollte.



**Abbildung 3.9: Interaktion von Rho1p mit chimären *Pkc1p***

Die Untersuchungen erfolgten erneut im Stamm PJ69-4A. Verwendete Vektoren waren pHPS45 (Rho1p wt), pHPS49 (Rho1p Q<sub>68</sub>H), pGBT9 (Vektor), pGADPKC (Pkc1p wt), pHPS127 (PKC  $\eta$  C1), pHPS125 (Raf C1) und pGAD424. Als Positivkontrolle dienten pVA3 und pTD1.



Dies sollte durch Dihybrid Untersuchungen mit den jeweiligen PKC Proteinen und der kleinen GTPase Rho1p näher betrachtet werden. Zunächst wurden diese Untersuchungen mit den „Vollängen“-Konstrukten des *PKC1*-Genes und der Mutanten durchgeführt. Wie Abbildung 3.9 erkennen läßt, entsprechen die erhaltenen Ergebnisse nicht den oben genannten Erwartungen. Sowohl Pkc1p als auch die Mutanten mit PKC  $\eta$ -C1 und Raf-C1 sind in der Lage mit Rho1p zu interagieren und diese Interaktion ist nach wie vor GTP abhängig, wie der Vergleich der Transformanden des *RHO1*-Allels mit dem *rho1* $Q_{68}H$ -Allel zeigt. Aufklärung brachte hier erst ein Kontrollversuch, der in Abschnitt 3.2.3.2 geschildert ist. Dort ist eine Dihybrid Untersuchung mit einer Pkc1p mit vollständiger Deletion der C1 Domäne beschrieben. Überraschenderweise war dieses Protein immer noch in der Lage mit Rho1p-GTP zu interagieren.

Der Grund für diese Interaktion ist eine weitere Kontaktstelle für Rho1p in Pkc1p, die im aminoterminalen Bereich zu finden ist und die in Abschnitt 3.2 näher untersucht wird. Um

AD:	BD:	Histidin- mangel Medium	X-Gal Agarose:
Positiv- kontrolle	Positiv- kontrolle		
Vektor	Vektor		
Vektor	Rho1p $Q_{68}H$		
Pkc1p	Rho1p $Q_{68}H$		
Pkc1p	Vektor		
Raf C1	Rho1p $Q_{68}H$		
Raf C1	Vektor		
PKC $\eta$ C1	Rho1p $Q_{68}H$		
PKC $\eta$ C1	Vektor		

**Abbildung 3.10: Interaktion N-terminaler Verkürzungen von Pkc1p und Pkc1p Mutanten mit Rho1p**

Die Durchführung des Versuchs war erneut wie unter Abb. 3.9 geschildert. Verwendete Plasmide waren: pGAD424 (Vektor AD), pGBT9 (Vektor BD), pHPS49 (Rho1p  $Q_{68}H$ ), pHPS140 (Pkc1p), pHPS138 (Raf C1), pHPS139 (PKC  $\eta$  C1) sowie pVA3 und pTD1 als Positivkontrolle.

einen Einfluß dieser Interaktion auf die Untersuchung der C1-Domäne auszuschließen, wurden die verwendeten Konstrukte N-terminal verkürzt. Dazu wurden die in Abbildung 3.9 geschilderten Plasmide mit *XmaI* und *XbaI* geschnitten, die freien Enden mit Klenow Polymerase aufgefüllt und die Plasmide religiert. Die resultierenden Proteine werden dabei aminoterminal um 252 Aminosäuren verkürzt. Betrachtet man nun erneut die Interaktion von Rho1p mit verkürzten

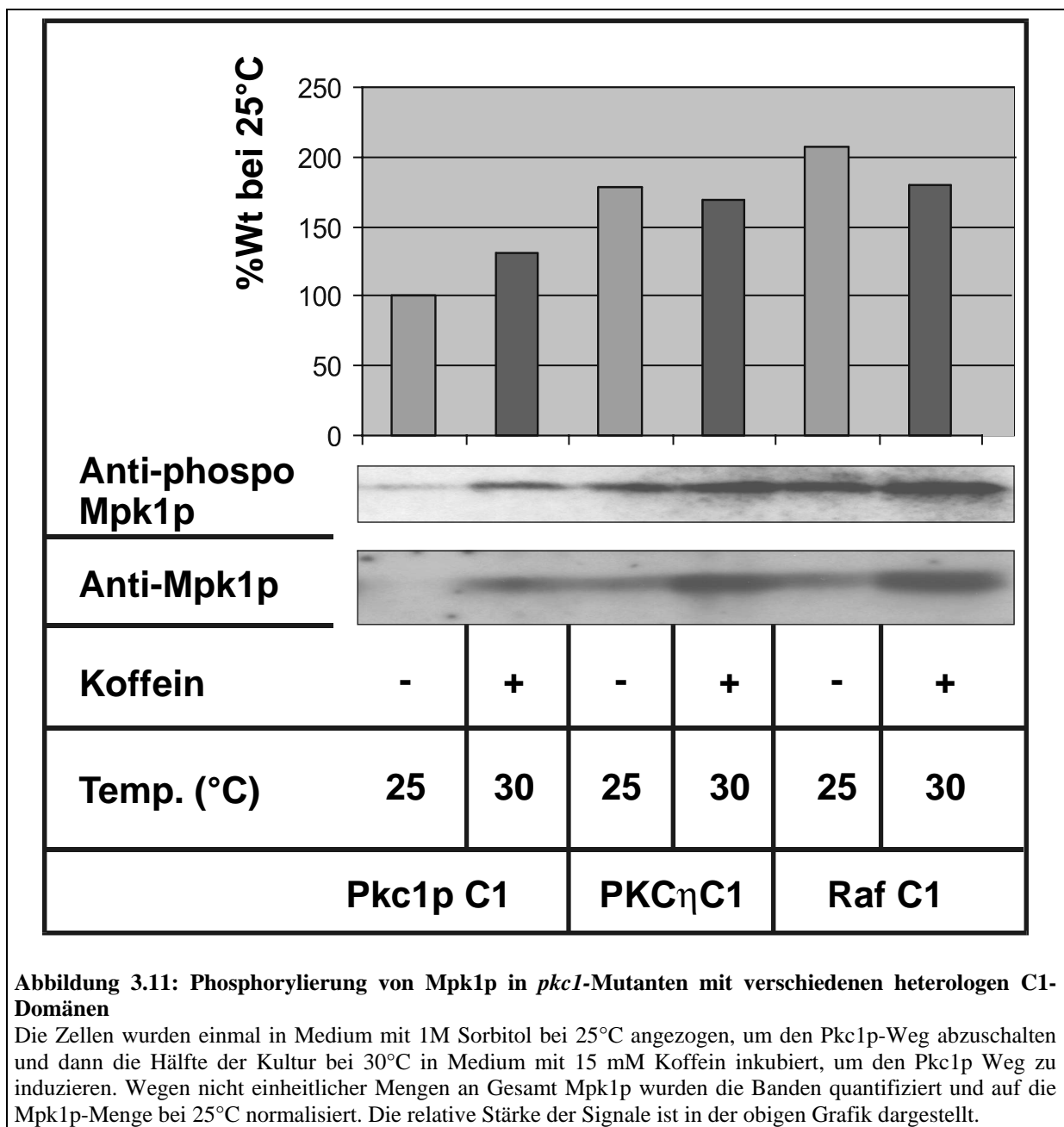
Pkc1p-Derivaten (Abbildung 3.10), so fällt nun ein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten auf. Zellen mit Hefe-C1 sind neben der Positivkontrolle als einzige in der Lage auf Histidin-Mangel-Medium zu wachsen. Eine Interaktion läßt sich zudem für Zellen mit C1 aus

Raf-Kinase nachweisen, wenn man den  $\beta$ -Galaktosidase-Reporter des Stammes PJ69-4A betrachtet. Die Blaufärbung ist ebenso intensiv, wie die der Zellen mit Wildtyp-C1. In Zellen, die Plasmide mit der C1 aus PKC  $\eta$  enthielten, war auch hier ein deutlicher Rückgang zu beobachten. Es sollte jedoch angemerkt werden, daß die beobachteten Interaktionen insgesamt sehr niedrig waren. So versetzte kein Konstrukt die Hefen dazu in die Lage, auf Adenin-Mangel-Medium zu wachsen. Die Adenin-Reporterkassette ist die stringenteste im Stamm PJ69-4A und erfordert die stärkste Interaktion (James *et al.*, 1996) zwischen Aktivierungs- und Bindedomänenfusion. Durch die Schwäche der hier beobachteten Wechselwirkung war es auch nicht möglich, die Unterschiede in der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zu quantifizieren. Die Unterschiede lagen im Bereich der Messungenauigkeiten. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich jedoch gut mit den Ergebnissen der zuvor durchgeführten phänotypischen Analyse in Einklang bringen. So können Raf-C1-Derivate von Pkc1p teilweise auf Selektivmedien wachsen und es läßt sich auch noch eine, wenn auch geringe, Interaktion nachweisen. Da die funktionelle Komplementation der C1-Domäne von Hefe Pkc1p nicht zu 100% erfolgt liegt wahrscheinlich daran, daß *in vivo* der Interaktionspartner von Raf-C1 die kleine GTPase Ras ist (Daub *et al.*, 1998). Dies führt zu der in Abbildung 3.10 wiedergegebenen Abschwächung der Interaktion zwischen Rho1p und der Pkc1p-Mutanten mit Raf-C1 und bedingt die in Abbildung 3.8 gezeigten Phänotypen. C1 von PKC  $\eta$  scheint hingegen gar nicht mehr in der Lage zu sein, eine Interaktion von Rho1p und Pkc1p zu vermitteln und führt so zu den Phänotypen in Abbildung 3.8. Somit scheint die Aktivierung von Pkc1p durch Rho1p die größte Bedeutung zu besitzen und eine Aktivierung durch DAG kann, wenn überhaupt vorhanden, nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

#### **3.1.3.3.3 Indirekter Nachweis der Pkc1p-Aktivität verschiedener Mutanten durch Bestimmung der Mpk1p Phosphorylierung**

Eine gängige Methode zum Nachweis der Aktivität im Proteinkinase C abhängigen Signaltransduktionsweg ist die Bestimmung der Konzentration des doppelt phosphorylierten Zustandes der MAP Kinase Mpk1p (Verna *et al.*, 1997; de Nobel *et al.*, 2000). Dabei werden bei einer „Western-Analyse“ sowohl Antikörper, die die Gesamtmenge an Mpk1p nachweisen, als auch Antikörper, die nur die doppelt phosphorylierte Form von Mpk1p erkennen eingesetzt. Eine höhere Aktivität der Proteinkinase C oberhalb der MAP-Kinase Kaskade sollte sich in einer Zunahme der Menge an phosphoryliertem Mpk1p Protein äußern. Bei diesem Versuch wurden dieselben Hefestämme verwendet, wie in Abbildung 3.8 beschrieben.

Betrachtet man die Stärke der Signale in Abbildung 3.11, so fällt auf, daß auch die Gesamtmenge an Mpk1p durch die Aktivität des Pkc1p-Weges reguliert zu werden scheint. Durch Induktion des Weges in koffeinhaltigem Medium kommt es zu einer Zunahme in allen betrachteten Mutanten. Dies kann zum Teil durch eine transkriptionelle Regulation des *MPK1*-Genes erklärt werden, die durch den Transkriptionsfaktor *RLM1* erfolgt (Jung und Levin, 1999). Andererseits ist zumindest die Mutante mit PKC  $\eta$  C1 in Medium mit 15 mM Koffein nicht mehr in der Lage zu wachsen. So läßt sich die Zunahme hier nicht mit einer erhöhten Aktivität im Pkc1p-Weg erklären. Somit muß neben der transkriptionellen Regulation von Mpk1p durch Rlm1p noch eine weitere Möglichkeit bestehen, die Proteinmenge von Mpk1p zu erhöhen. Es bleibt festzuhalten, daß in beiden Mutanten Bildung von Mpk1p und dessen Phosphorylierung im Vergleich zum Wildtyp dereguliert ist.



**Abbildung 3.11: Phosphorylierung von Mpk1p in *pkc1*-Mutanten mit verschiedenen heterologen C1-Domänen**

Die Zellen wurden einmal in Medium mit 1M Sorbitol bei 25°C angezogen, um den Pkc1p-Weg abzuschalten und dann die Hälfte der Kultur bei 30°C in Medium mit 15 mM Koffein inkubiert, um den Pkc1p Weg zu induzieren. Wegen nicht einheitlicher Mengen an Gesamt Mpk1p wurden die Banden quantifiziert und auf die Mpk1p-Menge bei 25°C normalisiert. Die relative Stärke der Signale ist in der obigen Grafik dargestellt.

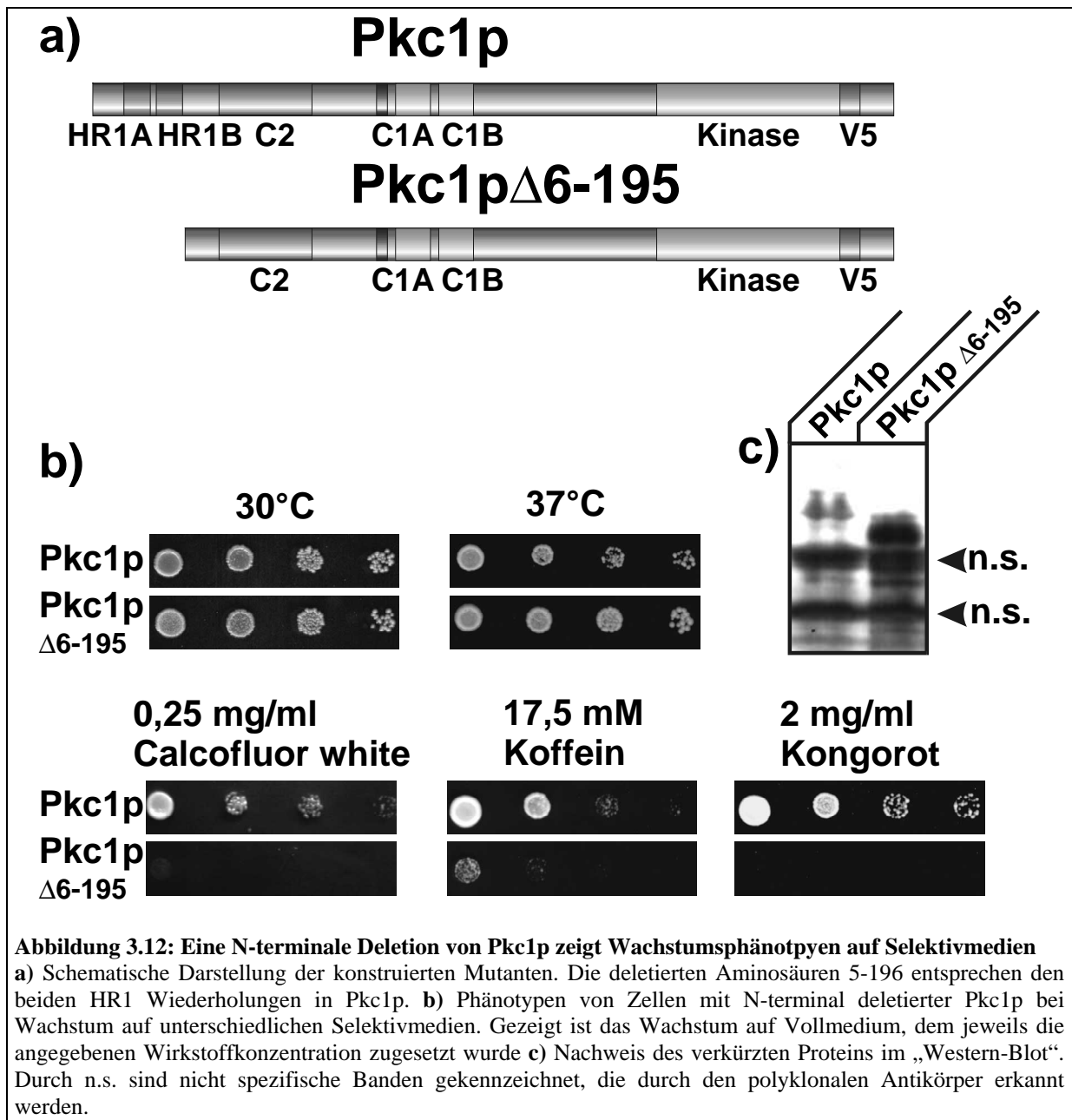
## 3.2 Untersuchung der aminoterminalen Region von Pkc1p

Vergleicht man die Proteinkinase C aus *S. cerevisiae* mit den Proteinkinase C-Isoenzymen höherer Eukaryonten, so fällt auf, daß das Hefeenzym deutlich länger ist, als z.B. die Homologen aus Säugerzellen. Die katalytischen und regulatorischen Domänen, wie C1, C2 und Pseudosubstratbindestelle, sind jedoch auch im Hefeenzym vorhanden (Hurley *et al.*, 1997). Damit läßt sich der Großteil der im Durchschnitt etwa 400 Aminosäuren, die das Hefeenzym länger ist, dem N-Terminus zuordnen. Erste Hinweise, auf eine mögliche Funktion dieses Bereiches ergaben sich durch die Entdeckung von Proteinen mit homologen Regionen und die Aufklärung deren Regulation (Watanabe *et al.*, 1996; Mellor *et al.*, 1998; Flynn *et al.*, 1998). In diesen sogenannten „Protein kinase C related kinases“ oder auch „PRK's“ binden an diese als „Homologie-Region 1“ oder „HR1“ bezeichnete Region kleine GTPasen und sind teilweise für die Lokalisierung (Mellor *et al.*, 1998) und teilweise für die Aktivierung der Kinasen verantwortlich (Flynn *et al.*, 1998). Aus diesen funktionellen Bereichen wurde eine Konsensussequenz für HR1 erstellt, die nun in die Datenbanken Einzug fand (Schultz *et al.*, 1998). Daraufhin wurde erstmals von Hurley *et al.* (1997) vom möglichen Vorhandensein einer HR1 in Pkc1p von *S. cerevisiae* berichtet, es lagen jedoch keinerlei experimentelle Daten zu einer möglichen Funktion dieser Region vor. Dies zu untersuchen war Ziel des folgenden Teils der vorliegenden Arbeit.

### 3.2.1 Deletion der HR1 in Pkc1p

Da keine Informationen über eine regulatorische Funktion der HR1 vorlagen, sollte zunächst diese gesamte Region des Enzymes entfernt werden. Mit einem PCR-Ansatz und nach außen gerichteten Oligonukleotiden wurde an Stelle der für die HR1 codierende DNA-Sequenz eine *Bgl*III-Schnittstelle eingefügt. Das resultierende Konstrukt wurde durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* in einen Hefevektor transferiert, isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurde die Expression des verkürzten Pkc1p-Konstruktes mit Hilfe einer „Western Analyse“ überprüft und die Phänotypen getestet. Die verkürzte Version von Pkc1p trägt eine Deletion von Aminosäure 6 bis 195. In Abbildung 3.12 a ist diese Verkürzung von Pkc1p schematisch dargestellt. Teil b der Abbildung zeigt die Wachstumsphänotypen auf verschiedenen Selektivmedien. Wie schon die in Abschnitt 3.1 geschilderten C1-Mutanten ist auch die N-terminale Deletion von Pkc1p nicht temperatursensitiv, zeigt aber Wachstumsdefekte auf verschiedenen Selektivmedien. So sind

die Zellen nicht mehr in der Lage bei Anwesenheit von Koffein, „Calcofluor white“ und Kongorot zu wachsen.

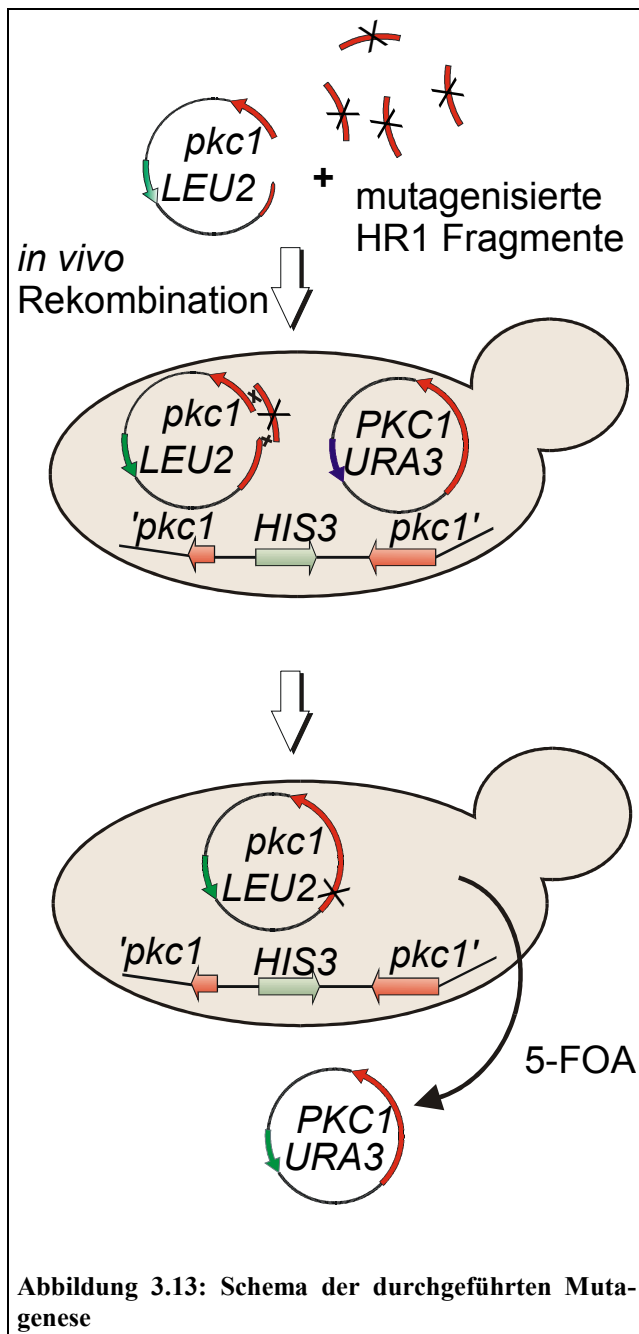


Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der N-terminale Bereich von Pkc1p, auf dem die beiden Wiederholungen des HR1-Motives liegen, eine Bedeutung für die Regulation des Enzymes besitzt. Einschränkend muß man jedoch anmerken, daß die Deletion von 191 Aminosäuren ein vergleichsweise drastischer Eingriff in die Struktur ist, wenn man bedenkt, daß schon einzelne Punktmutationen, wie in Abschnitt 3.1.2.2 geschildert, zu Wachstumsdefekten führen können. Damit ein solcher Einfluß der Deletion auf die Proteinstruktur oder Stabilität ausgeschlossen werden kann sollten nachfolgend Punktmutanten isoliert werden, die ähnliche Phänotypen wie die vollständige Domänendeletion besitzen.

## 3.2.2 Zufallsgerichtete Mutagenese der HR1 von Pkc1p mittels Polymerasekettenreaktion

### 3.2.2.1 Prinzip der zufallsgerichteten PCR-Mutagenese

Für die zufallsgerichtete Mutagenese eines definierten DNA Bereiches bietet sich eine Polymerasekettenreaktion mit stark erniedrigter Spezifität an (Spee *et al.*, 1993). Dabei werden Fragmente mit einem oder mehreren Basenaustauschen erhalten und über homologe

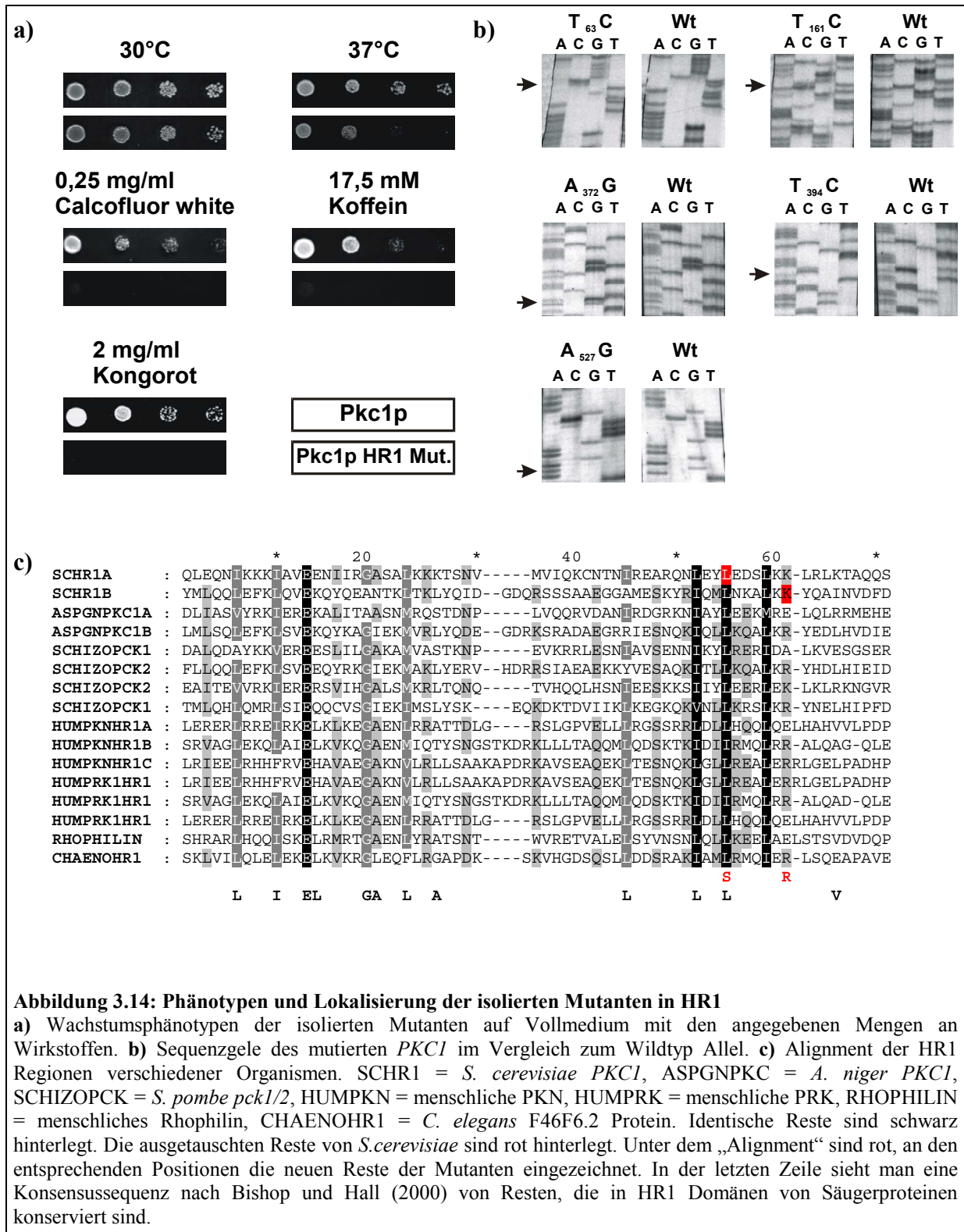


Rekombination in das *pkc1*-Gen eingebracht. Das Prinzip der verwendeten Methode ist in Abbildung 3.13 schematisch wiedergegeben. Da eine *pkc1*-Deletion im verwendeten Stammhintergrund letal ist (Jacoby *et al.*, 1997), wurde die *in vivo*-Rekombination in Anwesenheit eines Wildtyp *PKC1*-Allels auf einem Vektor mit anschließendem Plasmidtausch unter Erhöhung des Selektionsdruckes mit 5-FOA durchgeführt. Da nicht bekannt war in wie weit die resultierenden Mutanten Wachstumsdefekte zeigen, fand dieser Vorgang in Anwesenheit von 1M Sorbitol zur osmotischen Stabilisierung statt. Am Ende der Mutagenese erhält man Hefezellen, die ein *pkc1*-Allel mit einem oder mehreren Aminosäureaustauschen in der HR1-Sequenz tragen. Nach dem Plasmidtausch wurden die Zellen auf Medium mit 10 mM Koffein abgestempelt und sensitive Klone isoliert. Von ursprünglich ca. 3000 Kolonien konnten drei isoliert werden, die einen Wachstumsdefekt auf Minimalmedium mit

10 mM Koffein zeigten. Isolation und Sequenzierung der Plasmide ergab, daß zwei der isolierten Allele zu einem Stopcodon führten. Aus diesem Grund wurden sie nicht weiter untersucht.

### 3.2.2.1 Phänotypen und Lokalisierung der isolierten Mutationen

Die Sequenzierung der verbleibenden Mutante von *pkc1* ergab insgesamt einen Austausch von 5 Basenpaaren (Abb. 3.14 b). Der erste Austausch ist Thymin an Position 63, das gegen



**Abbildung 3.14: Phänotypen und Lokalisierung der isolierten Mutanten in HR1**

**a)** Wachstumsphänotypen der isolierten Mutanten auf Vollmedium mit den angegebenen Mengen an Wirkstoffen. **b)** Sequenzgel des mutierten *PKC1* im Vergleich zum Wildtyp Allel. **c)** Alignment der HR1 Regionen verschiedener Organismen. SCHR1 = *S. cerevisiae PKC1*, ASPGNPKC = *A. niger PKC1*, SCHIZOPCK = *S. pombe pck1/2*, HUMPKN = menschliche PKN, HUMPRK = menschliche PRK, RHOPHILIN = menschliches Rho-philin, CHAENHR1 = *C. elegans F46F.2* Protein. Identische Reste sind schwarz hinterlegt. Die ausgetauschten Reste von *S. cerevisiae* sind rot hinterlegt. Unter dem „Alignment“ sind rot, an den entsprechenden Positionen die neuen Reste der Mutanten eingezeichnet. In der letzten Zeile sieht man eine Konsensussequenz nach Bishop und Hall (2000) von Resten, die in HR1 Domänen von Säugerproteinen konserviert sind.

einen Cytosinrest ausgetauscht ist. Dies führt jedoch nicht zu einem Aminosäureaustausch und ist somit eine stille Mutation. Der zweite Austausch ist der Thyminrest 161, der gegen Cytosin ausgetauscht ist. Dies führt zu einem Austausch von Leucin 54 zu Serin in der

abgeleiteten Aminosäuresequenz. Während diese Austausche beide in der ersten Wiederholung des HR1-Motives liegen, finden sich die nächsten Austausche in der zweiten Wiederholung. Hier ist zunächst der Adenosinrest an Position 372 gegen einen Guaninrest ausgetauscht. Dadurch wird zwar eine *EcoRI* Schnittstelle zerstört, es kommt jedoch wiederum nicht zu einem Aminosäureaustausch. Auch diese Mutation ist still, genauso wie die nächste, bei der Thymin an Position 394 zu Cytosin mutiert wurde. Der letzte Austausch in der isolierten Mutante findet sich beim Adenin an Position 527, das gegen einen Guaninrest ausgetauscht war. Dies führt zu einem Wechsel der Aminosäuresequenz von Lysin 176 zu Arginin. Nun stellte sich die Frage, ob die in Abbildung 3.14 b gezeigten Wachstumsphänotypen auf die Kombination der Mutationen zurückzuführen sind, oder ob eine der Mutationen zum Herbeiführen der Phänotypen ausreichend ist. Betrachtet man den Sequenzvergleich in Abbildung 3.14 a, so fällt auf, daß der Austausch L<sub>54</sub>S in einem stark konservierten Rest erfolgt ist, während K<sub>176</sub>R weniger stark konserviert ist. Zudem findet sich in einigen der Homologen an dieser Position ebenfalls ein Arginin. Beides sind basische Reste. Leucin trägt jedoch eine aliphatische und damit hydrophobe Seitenkette, während Serin eine Hydroxylgruppe trägt und damit wesentlich hydrophiler ist. Dies legte die Vermutung nahe, daß der Austausch L<sub>54</sub>S für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist. Dies sollte im Folgenden überprüft werden.

### 3.2.3 Untersuchungen an der Pkc1p L<sub>54</sub>S Mutante

#### 3.2.3.1 Rekonstruktion der Mutation mittels *in vitro*-Mutagenese

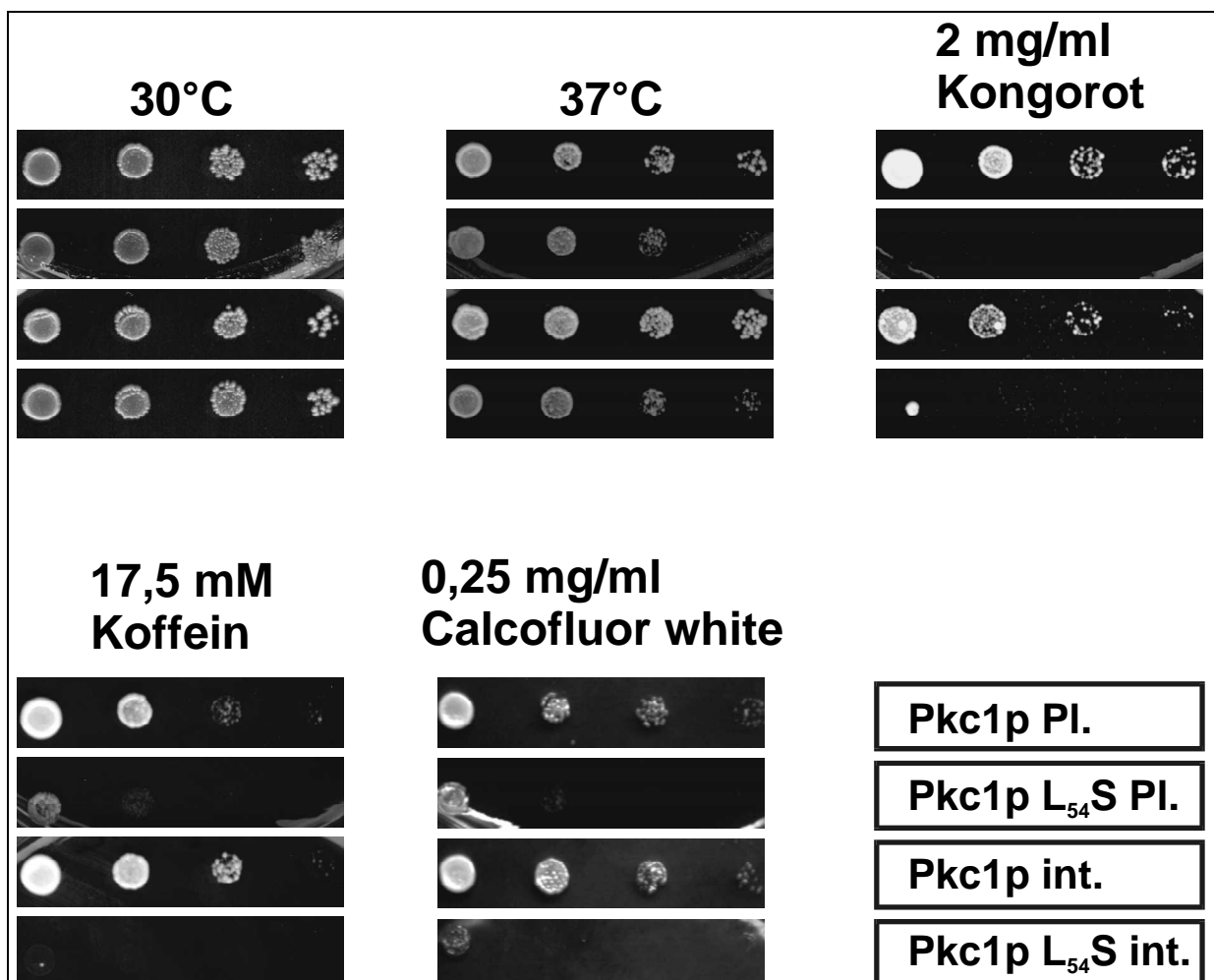
Die Frage, ob tatsächlich der Austausch von Leucin 54 zu Serin für die in Abb. 3.14 a gezeigten Phänotypen verantwortlich ist, sollte durch erneute Konstruktion dieser Mutanten über *in vitro*-Mutagenese geklärt werden. Gleichzeitig sollte eine weitere Mutante in dem in allen HR1 Domänen zu 100% konservierten Rest, Glutamat an Position 17 erzeugt werden. Die Mutagenese erfolgte nach der Methode von (Boles und Miosga, 1995) die in einer ersten PCR zunächst einen sogenannten „Megaprimer“ erzeugt. Am Ende werden in einer zweiten PCR ausschließlich mutierte DNA Stränge amplifiziert. Da durch die PCR auch unerwünschte Fehler in die DNA-Sequenz eingefügt werden können, muß anschließend das erhaltene Fragment sequenziert werden. Aus diesem Grund wurde ein möglichst kleines DNA-Fragment umklontiert. Dadurch sollte der zu sequenzierende Bereich so klein wie möglich gehalten werden. Die resultierenden Vektoren pHPS98 (L<sub>54</sub>S) und pHPS99 (E<sub>17</sub>A) (siehe Tabelle 2.6) wurden über *in vivo*-Rekombination und Plasmidtausch in die Hefezellen



eingbracht. Die Sequenzierung des mutagenisierten Bereiches zeigte, daß lediglich die erwünschten Austausche in dem *pkc1*-Gen vorlagen.

### 3.2.3.1 Phänotypen der Mutanten

Obwohl der Austausch E<sub>17</sub>A in einem stark konservierten Rest erfolgte, zeigten Hefezellen mit diesem Allel keinen Phänotyp. Die Phänotypen der Mutanten L<sub>54</sub>S sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Vektor pHPS98 wurde dieses mutierte Allel (pHPS105), ebenso wie das Wildtyp-Allel (pHPS103) noch in einen integrativen Vektor umklont und dieser in Hefezellen mit einer Deletion im *pkc1*-Gen integriert. Die Phänotypen dieser Stämme sind ebenfalls in Abbildung 3.15 dargestellt. Man erkennt, daß in allen Fällen sowohl die Mutation L<sub>54</sub>S auf dem Plasmid, als auch deren Integration zu



**Abbildung 3.15: Wachstumspheotypen der durch *in vitro* Mutagenese erhaltenen Pkc1p HR1 Mutanten L<sub>54</sub>S**

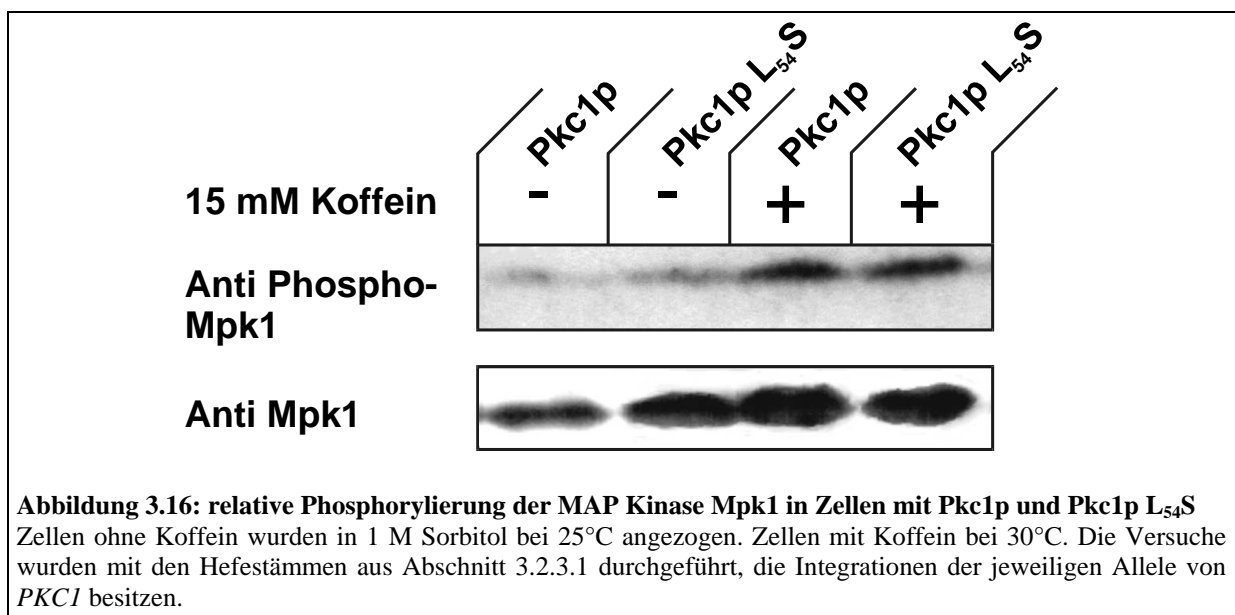
Gezeigt sind die Phänotypen auf Vollmedium mit den angegebenen Konzentrationen an Wirkstoffen. Die Hefestämme wurden konstruiert, wie in Abschnitt 3.1.2.1 beschrieben. Pkc1p Pl. bzw. Pkc1p L<sub>54</sub>S Pl. bezeichnet Hefestämme mit *PKC1* bzw. *pkc1* auf einem Plasmid, während Pkc1p int. und Pkc1p L<sub>54</sub>S jeweils das integrierte Gegenstück bezeichnen.

ähnlichen Wachstumsdefekten führt, wie die, welche für die in Punkt 3.2.2.1 ursprünglich isolierte Mutante beobachtet wurden. Damit konnte bewiesen werden, daß ein Austausch von

Leucin an Position 54 zu Serin ausreichend ist, um die beobachteten Wachstumsdefekte hervorzurufen.

### 3.2.3.2 Phosphorylierung der MAP-Kinase Mpk1p in Pkc1p L<sub>54</sub>S-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp

Durch die beobachteten Phänotypen stellt sich, wie schon bei den Mutanten in der C1 Domäne in Abschnitt 3.1, die Frage, welchen Einfluss die Mutation auf die Signalweiterleitung im Pkc1p-Weg hat. Dazu sollte erneut, wie schon in Abschnitt 3.1.3.3.3 die Phosphorylierung der MAP-Kinase Mpk1 nachgewiesen werden. Wie man in Abbildung 3.16 sehen kann unterscheidet sich die Phosphorylierung von Mpk1p in Mutanten der HR1 nicht von der des Wildtypes. Dies gilt sowohl für Zellen, deren Pkc1p-Weg nicht aktiviert ist (Anzucht bei 25°C in Medium mit 1 M Sorbitol) als auch für Zellen, deren Pkc1p-Weg aktiviert ist (Anzucht bei 30°).

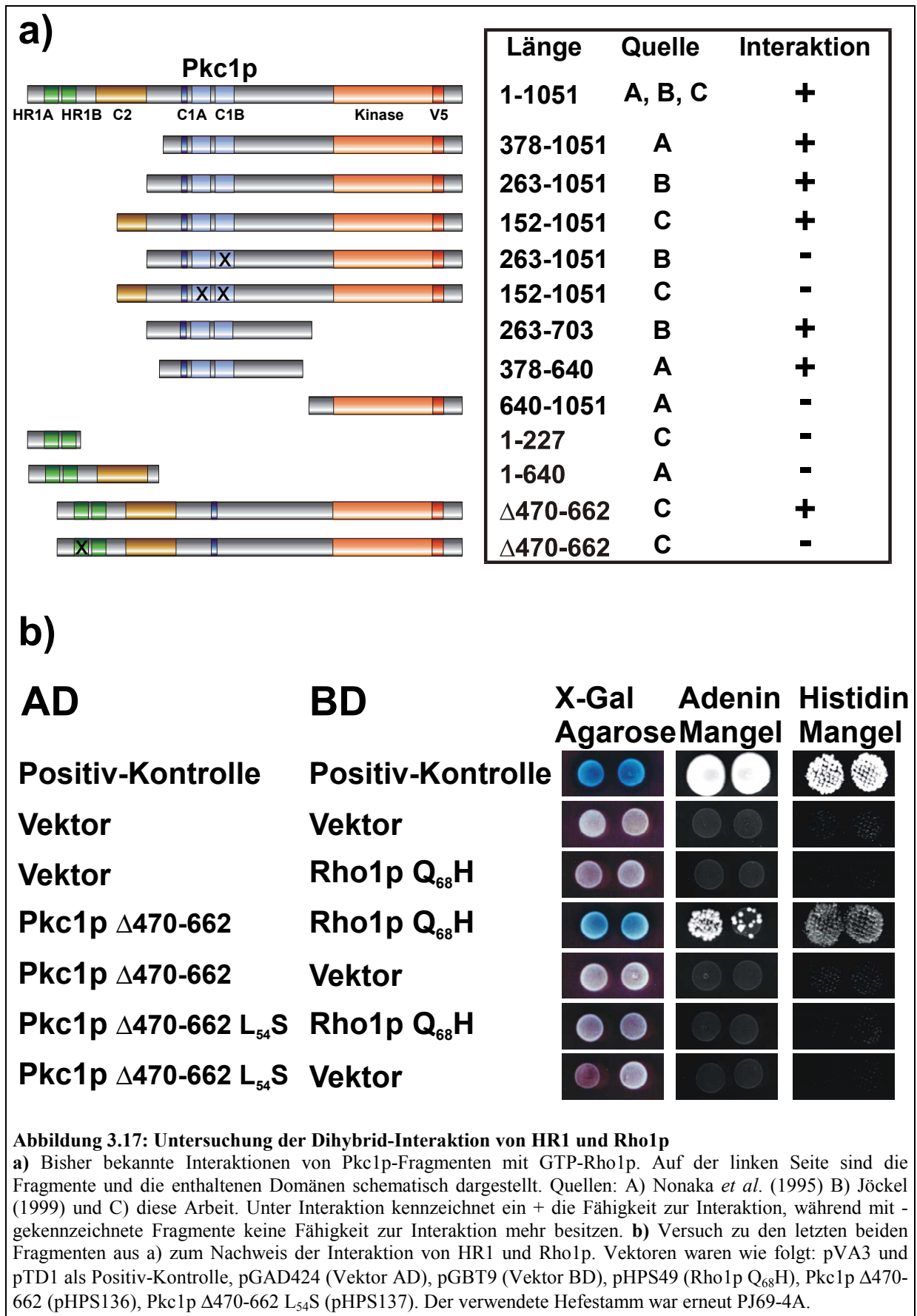


### 3.2.3.2 Interaktionen mit HR1 von Pkc1p

Die bisher aufgeklärten Funktionen von HR1-Domänen umfassen immer die Bindung einer kleinen GTPase. So ist diese Domäne für die Bindung von Rho an PRK (Mellor *et al.*, 1998), PKN und Rhophilin (Watanabe *et al.*, 1996) verantwortlich. Dies legt zunächst die Vermutung nahe, daß die HR1-Wiederholungen in Pkc1p ebenfalls eine kleine GTPase binden. Ein möglicher Kandidat hierfür ist das schon in Abschnitt 3.1 beschriebene Rho1p. Eine Bindung von Rho1p stünde jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen von (Nonaka *et al.*, 1995), bei deren Untersuchungen ein N-terminales Fragment von Pkc1p nicht mit Rho1p interagiert. Trotzdem wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst versucht eine Interaktion von Rho1p mit einem N-terminalen Fragment von Pkc1p, welches nur die HR1 Domäne enthält,

nachzuweisen. Es ließ sich jedoch auch hier keine Interaktion erkennen. Aus diesem Grund wurden alle anderen in der Hefe vorhandenen Mitglieder der Rho Familie (Rho2p, Rho3p, Rho4p, CDC42 und Rho5p) auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit HR1 von Pkc1p getestet. Dabei standen jeweils sowohl das Wildtyp-Allel, als auch eine aktivierte Variante von Rho2p, Rho3p, Rho4p und CDC42 zur Verfügung (Imamura *et al.*, 1997). Von Rho5p wurde im Rahmen dieser Arbeit eine daueraktive Mutante hergestellt und Wildtyp- sowie aktiviertes Allel in einen Dihybridvektor kloniert (siehe Tabelle 2.6). Jedoch zeigte keines der untersuchten Proteine eine Interaktion mit der HR1-Domäne von Pkc1p. Auch die Durchführung eines „Dihybrid-Screens“ erbrachte keine interagierenden Proteine. Erst die Ergebnisse der Versuche in Abschnitt 3.1.1.1 und 3.1.3.3.2 erbrachten Hinweise auf eine mögliche Funktion der HR1. In diesen Versuchen war zu erkennen, daß selbst Mutanten, die auf Grund der Phänotypen nicht mehr in der Lage sein sollten mit Rho1p zu interagieren, teilweise eine stärkere Interaktion mit Rho1p zeigten als der Wildtyp. Deletiert man jedoch den Aminoterminus von Pkc1p, so bleibt der Wildtyp von Pkc1p befähigt mit Rho1p zu interagieren, während diese Fähigkeit in den Mutanten verloren geht.

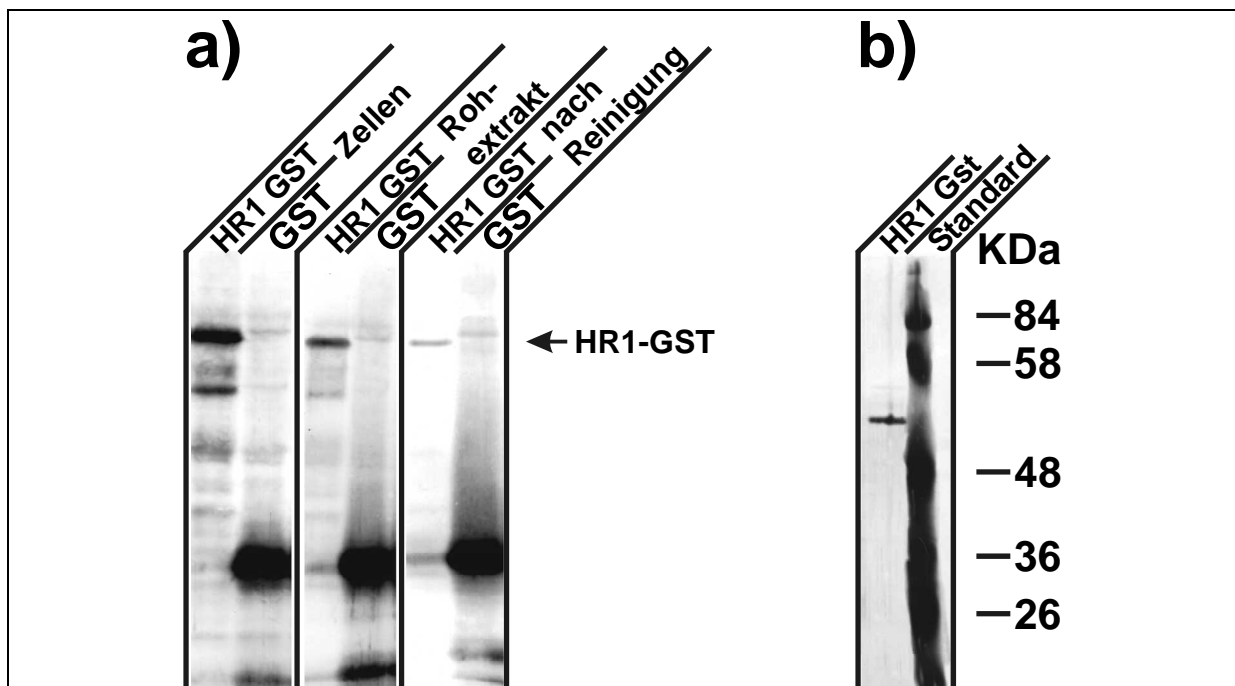
Somit scheint der Aminoterminus von Pkc1p an der Bindung von Rho1p beteiligt zu sein, obwohl der Aminoterminus alleine nicht mit Rho1p interagiert. Die bisher bekannten Interaktionen von Fragmenten, die im Dihybrid-System auf Interaktion mit Rho1p getestet wurden sind in Abbildung 3.17 a zusammengefaßt. Darunter sind in Teil b die hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt, die darauf hinweisen, daß Rho1p spezifisch mit der HR1-Domäne interagiert. Während ein Pkc1p mit deletierter C1-Domäne noch in der Lage ist, mit aktiviertem Rho1p zu interagieren, geht diese Fähigkeit verloren, wenn man zusätzlich das Leucin an Position 54 zu Serin in HR1A mutiert. Der Test zeigt für keinen der verwendeten Reporter ( $\beta$ -Galaktosidase, Wachstum auf Adenin und Wachstum auf Histidin) mehr eine Wechselwirkung. Offensichtlich sind sowohl die HR1-Domäne, als auch die C1-Domäne an der Interaktion mit Rho1p beteiligt.



Da mit Hilfe des Dihybrid Systems keine Interaktion nur mit dem für die HR1 Domäne kodierenden Bereiches und Rho1p nachgewiesen werden konnte, wurde im Folgenden ein biochemischer Ansatz gewählt.

### 3.2.3.3 Expression und Aufreinigung eines HR1-Peptides aus *E.coli*

Für die biochemische Untersuchung der Interaktion von Rho1p und HR1 von Pkc1p wurde versucht eine mit GST fusionierte HR1-Domäne in *E. coli* überzuproduzieren und mit Hilfe von Glutathion Sepharose aufzureinigen. Dazu wurden zunächst die ersten 696 Nukleotide des *PKC1*-Genes in den Vektor pGEX-3X kloniert. Dieses Fusionskonstrukt kodiert für Glutathion-S-Transferase und die ersten 232 Aminosäuren von Pkc1p auf denen sich beide Wiederholungen der HR1-Domäne befinden. Die Aufreinigung wird dadurch ermöglicht, daß die Glutathion-S-Transferase an Glutathion bindet, welches chemisch an Sepharose gekoppelt ist. Dadurch wird das Fusionsprodukt immobilisiert und nicht gebundene Proteine können durch Waschen entfernt werden. Durch Zugabe reduzierten Glutathions kann anschließend das Fusionprotein von der Matrix gelöst werden.



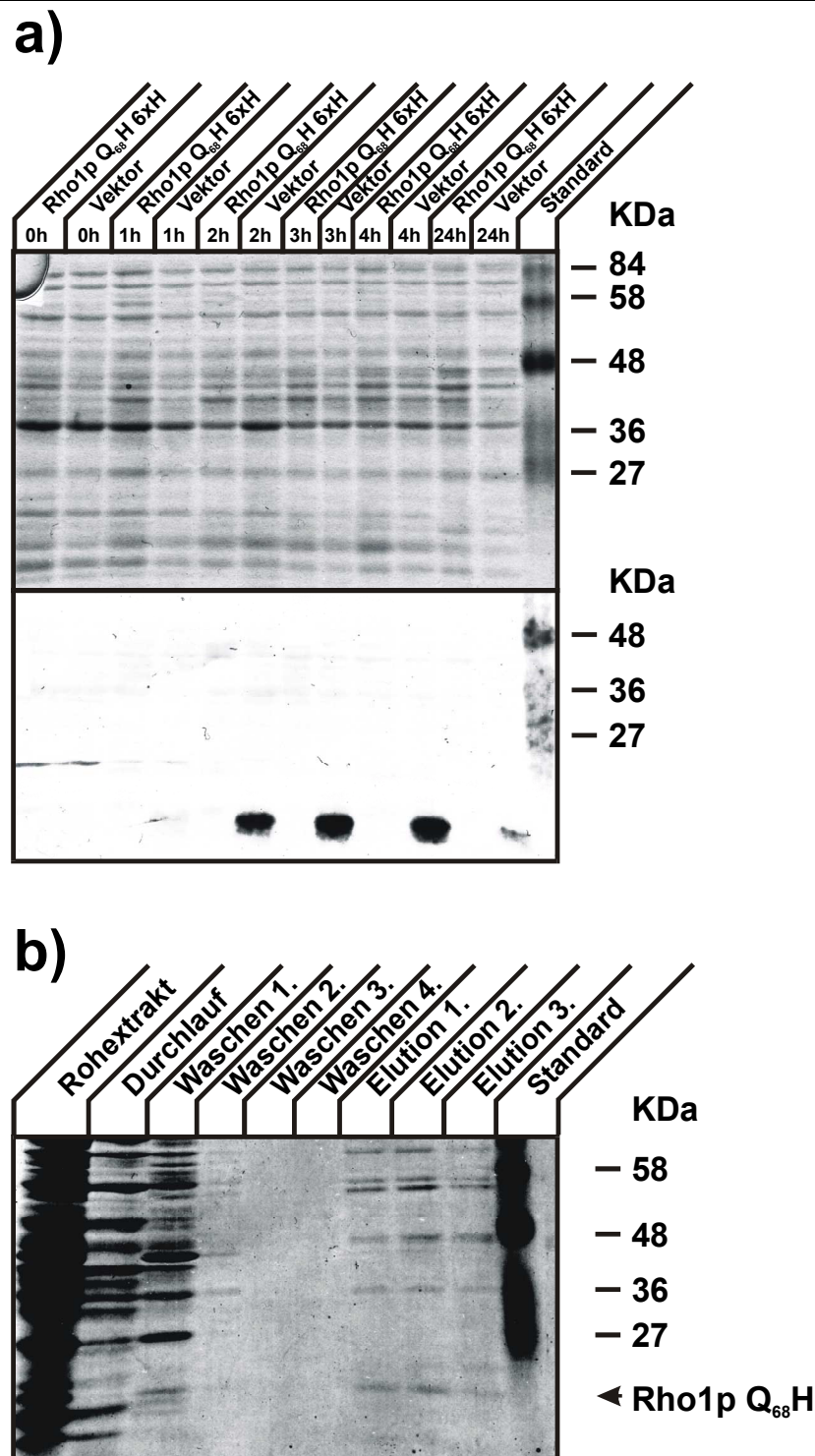
**Abbildung 3.18: Expression und Reinigung der GST-fusionierten HR1-Domäne von Pkc1p**

**a)** „Western“-Analyse von HR1 fusioniert an Glutathion-S-Transferase und, zur Kontrolle, Glutathion-S-Transferase. Aufgetragen wurden einmal Protein aus ganzen Zellen, einmal Rohextrakt und einmal die Proteine nach Aufreinigung mit Glutathion Sepharose. Zur Detektion wurde ein gegen die Glutathion-S-Transferase gerichtetes, polyklonales Antiserum verwendet. **b)** Gezeigt ist die Silberfärbung eines SDS-Geles mit dem HR1-GST-Fusionsprotein nach Aufreinigung.

Wie man in Abbildung 3.18 b erkennen kann, konnte das 55 kDa große Fusionsprotein so weit aufgereinigt werden, daß es für weitere, biochemische Untersuchungen eingesetzt werden kann.

### 3.2.3.4 Expression und Aufreinigung von Rho1p aus *E.coli*

Der Bedarf für gereinigtes Rho1p ergab sich nicht nur durch geplante Interaktionsstudien mit der HR1-Domäne von Pkc1p, sondern schon früher bei der Bestimmung der *in vitro*-Kinaseaktivität (Abschnitt 3.1.1.2) von C1-Mutanten. Insbesondere für letzteren Versuch muß ein vergleichsweise großer Grad an Aufreinigung erreicht werden, da kontaminierende Proteine, und hier speziell Kinasen, zu einer unspezifischen Phosphorylierung des Substratpeptides führen können. Für diesen Versuch wurde das aktivierte Rho1p<sub>Q68H</sub> Protein mit einer Markierung von sechs Histidinresten versehen. Diese sind in der Lage Nickelionen, die an eine Nitriloacetat-Matrix gebunden sind, komplexometrisch zu binden. Dadurch wird das Fusionsprotein immobilisiert und kann durch Waschen von den anderen Proteinen getrennt werden. Durch Zugabe von Imidazol kann der Komplex gelöst werden und man erhält das gereinigte Protein. Da die Überproduktion von aktiviertem Rho1p in *S. cerevisiae* zu einem Zellzyklus-Arrest führt (Espinete *et al.*, 1995), wurde das Protein erneut in *E. coli* exprimiert. Wie man in Abbildung 3.19 a erkennen kann wird das rekombinante Protein von *E. coli* exprimiert, in der „Western“-Analyse ist ein deutliches Signal zu erkennen. Abbildung 3.19 b zeigt die einzelnen Schritte der Aufreinigung. Es ist zu erkennen, daß in den Elutionsfraktionen weitere Proteine, neben dem Rho1p Q<sub>68</sub>H zu erkennen sind. Im Wesentlichen sind dies fünf Proteine mit einem deutlich höheren Molekulargewicht als das rekombinante Protein. Bevor das Protein für weitere Studien verwendet werden kann, müssen diese Kontaminationen durch weitere Aufreinigungsschritte entfernt werden. Dies war jedoch im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.



**Abbildung 3.19: Expression von His-markiertem Rho1p Q<sub>68</sub>H in *E. coli***

**a)** Nachweis der Expression von 6xHis-markiertem Rho1p Q<sub>68</sub>H in *E. coli*. Gezeigt ist oben ein mit „Coomassie brilliant blue“ gefärbtes Polyacrylamid-Gel und unten eine „Western“-Analyse mit einem gegen 6xHis gerichteten polyklonalen Antiserum. *E. coli* Zellen mit pHPS9 (Rho1p Q<sub>68</sub>H 6xH) und pQE9 (Vektor) wurden in LB Medium angezogen. Zum Zeitpunkt 0 h wurde die Expression mit IPTG induziert und nach 1, 2, 4 und 24 h Proben genommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit gleichem Volumen 2 x Probenpuffer versehen und 10 min. gekocht. **b)** Aufreinigung von Rho1p Q<sub>68</sub>H unter Verwendung einer Ni-NTA Agarose Säule. Die Durchführung ist in Abschnitt 2.2.5.5.4 beschrieben. Gezeigt ist ein mit „Coomassie brilliant blue“ gefärbtes Polyacrylamid-Gel. Aufgetragen wurde jeweils ein Teil der bei den einzelnen Aufreinigungsschritten erhaltenen Fraktionen. Da Rho1p Q<sub>68</sub>H nicht rein dargestellt werden konnte, ist die entsprechende Bande mit einem Pfeil markiert.

### 3.3 Kombination von C1- und HR1-Mutanten

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten eine Beteiligung von C1-Domäne und HR1-Domäne bei der Aktivierung von Hefe-Pkc1p durch Pkc1p. Da Mutanten in den jeweiligen Domänen einen, gegenüber einer Pkc1p Deletion deutlich abgeschwächten Phänotyp zeigen, sollte untersucht werden, welche Phänotypen eine Kombination von Mutationen in beiden Domänen hervorbringt. Zu diesem Zweck wurden Teile von *PKC1*, die die entsprechenden Mutationen tragen zusammenkloniert. Der resultierende Vektor pHPS115 wurde in den heterozygoten *S. cerevisiae* Stamm MCY-23D, der sowohl eine *pkc1*-Deletion als auch ein Wildtyp-Allel des Genes trägt, integriert. Die Tetradenanalyse nach Sporulation von 30 Tetraden erbrachte in keinem Fall eine Segregante, welche gleichzeitig die Deletion und das *pkc1*-Allel mit den Mutationen in C1 und HR1 trägt. Dies läßt den Schluß zu, daß diese Mutationen zusammen für die Zellen letal sind, da Pkc1p nicht mehr durch Rho1p aktiviert werden kann.

### 3.4 Entwicklung eines Ansatzes zur Identifikation von Genen mit negativer regulatorischer Wirkung auf den Pkc1p-Signaltransduktionsweg

Die Änderungen im Transkriptionsprofil einer Hefezelle, die durch einen Signaltransduktionsweg, wie z.B. den Pkc1p-Weg induziert werden (Roberts *et al.*, 2000), müssen bei Änderungen im externen Milieu auch schnell wieder rückgängig gemacht werden. Ein solcher Fall wäre für den Pkc1p-Weg z.B. denkbar, wenn sich die Bedingungen von hypoosmolar zu hyperosmolar ändern. Komponenten, die in einem solchen Fall aktiv an einer negativen Regulation des Pkc1p-Weges beteiligt sind, sind bisher kaum charakterisiert. Bei den beschriebenen Komponenten, die den Signalfluß negativ regulieren, handelt es sich in der Regel um GTPase aktivierende Proteine, welche auf Rho1p wirken. Zu diesen Proteinen gehören hauptsächlich Sac7p (Schmidt *et al.*, 1997) und Lrg1p (Lorberg, 2001).

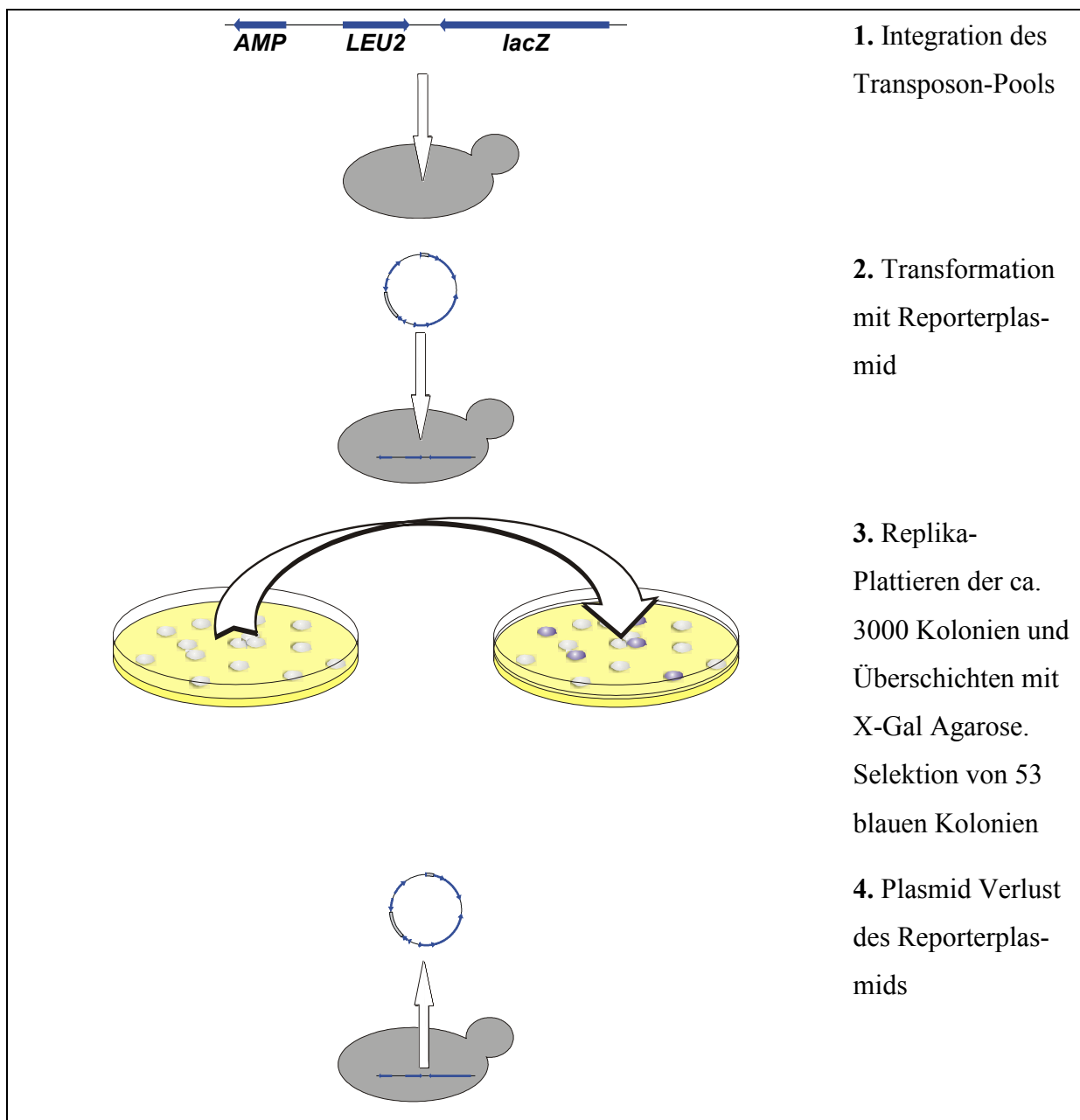
Ziel dieses Teiles der Arbeit war es, eine Methode zur Identifikation weiterer Komponenten mit negativer regulatorischer Wirkung auf den Pkc1p-Weg zu entwickeln und entsprechende Gene zu isolieren.

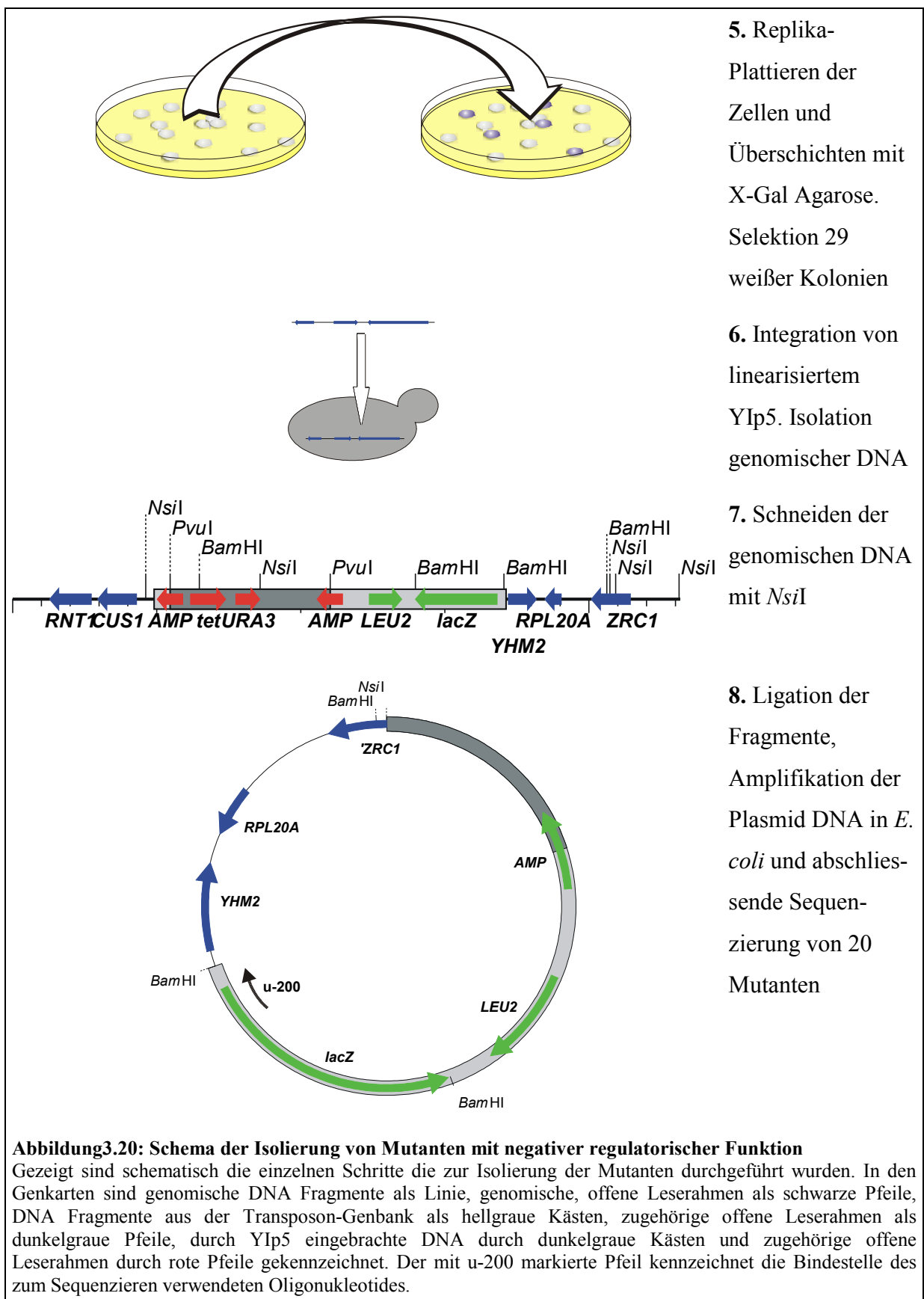


### 3.4.1 Prinzip des Ansatzes

Das Schema mit dessen Hilfe die Mutanten isoliert wurden ist in Abbildung 3.20 dargestellt. Dabei werden in einem ersten Schritt mit Hilfe einer Transposon-Genbank (Burns *et al.*, 1994) zufallsverteilte Insertionen in das Genom der Hefe eingefügt. Insetiert ein solches Fragment in einen offenen Leserahmen oder im Promotorbereich eines Genes, so kann es zu Disruptionen oder einer Herabsetzung der Transkription kommen. Mutanten mit solchen Defekten, die gleichzeitig eine erhöhte Aktivität im Pkc1p-Signaltransduktionsweg zeigen, besitzen entweder eine negative, regulatorische Funktion oder sind anderweitig an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität der Zelle beteiligt. Damit auch Gene isoliert werden können, deren Wirkung sich nicht phänotypisch ausprägt, wurde für den hier entwickelten Ansatz erneut das in Abschnitt 3.1.1.3 beschriebene Reportersystem verwendet. Um das System einfach in verschiedene Mutanten einbringen zu können, wurden alle erforderlichen Komponenten in einem *CEN/ARS* Vektor zu pHPS100 (Kirchrath *et al.*, 2000) zusammengeführt. Dieser Vektor enthält also neben dem *TRP1*-Gen ein aminoterminal verkürztes, an die *LexA* Bindedomäne fusioniertes *rlm1*-Gen und das  $\beta$ -Galactosidase-Gen unter Kontrolle des *GALI/10*-Promotors. Die stromaufwärts liegenden, aktivierenden Sequenzen dieses Promotors sind allerdings durch *LexA*-Bindestellen ersetzt. Dieser Vektor wurde dann in den Pool von Mutanten transformiert (Abbildung 3.20; 2. Schritt). Die resultierenden Zellen wurden im dritten Schritt „Replika-plattiert“, über Nacht inkubiert und mit „X-Gal-haltiger“ Agarose überschichtet. Kolonien die nun schneller eine Blaufärbung zeigten, als eine ebenfalls mit pHPS100 transformierte Wildtyp-Kontrolle wurden von den Ursprungplatten isoliert. Durch Anziehen dieser Zellen in Vollmedium wurde ihnen in einem 4. Schritt der Verlust des Reporterplasmides ermöglicht. Diese Kolonien wurden erneut „Replika-plattiert“, diesmal auf Medium, welches auf den Marker von pHPS100 (das *TRP1*-Gen) selektiert und auf Vollmedium. Ausgewählt wurden nun solche Kolonien, die den Vektor pHPS100 verloren hatten, also nicht mehr auf Tryptophan-Mangel-Medium wachsen konnten und auch keine Blaufärbung mehr zeigten. Bei Zellen, die kein Reporterplasmid mehr enthielten aber trotzdem noch Blaufärbung zeigten, ist das  $\beta$ -Galactosidase-Gen der Transposon-Genbank hinter einem Hefe-eigenen Promotor inseriert. In diesem Fall spiegelt die Blaufärbung nicht die Aktivität im Pkc1p-Weg wider und die Zellen sind für eine weitere Betrachtung ungeeignet. Während die bisherigen Schritte der Isolation der gesuchten Mutanten dienten, sind die folgenden Schritte darauf ausgerichtet die Mutation zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein mit *PvuI* geschnittener Vektor YIp5 in das

Ampicillin-Resistenz-Gen des Vektors der Transposon-Genbank integriert (Abbildung 3.20 Schritt 6). Von diesen Zellen wurde chromosomale DNA isoliert, mit *NsiI* geschnitten und religiert (Abbildung 3.20 Schritt 7). Dadurch entstehen Plasmide, welche die für eine Replikation in *E. coli* benötigten Elemente von YIp5 enthalten. Zusätzlich zu den *lacZ*-, *LEU2*- und Ampicillin-Resistenz-Genen enthält der Vektor genomische DNA, die bis zur dem Integrationsort des Transposonplasmides am nächsten liegenden *NsiI*-Schnittstelle reicht (Abbildung 3.20 Schritt 8). Abschließend erfolgte die Amplifikation der Plasmide in *E. coli* und Sequenzierung mit dem Oligonukleotid u-200. Durch Verwendung des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) wurde über einen Vergleich mit der Genomsequenz von *S. cerevisiae* der jeweilige Integrationsort ermittelt.





**Abbildung3.20: Schema der Isolierung von Mutanten mit negativer regulatorischer Funktion**

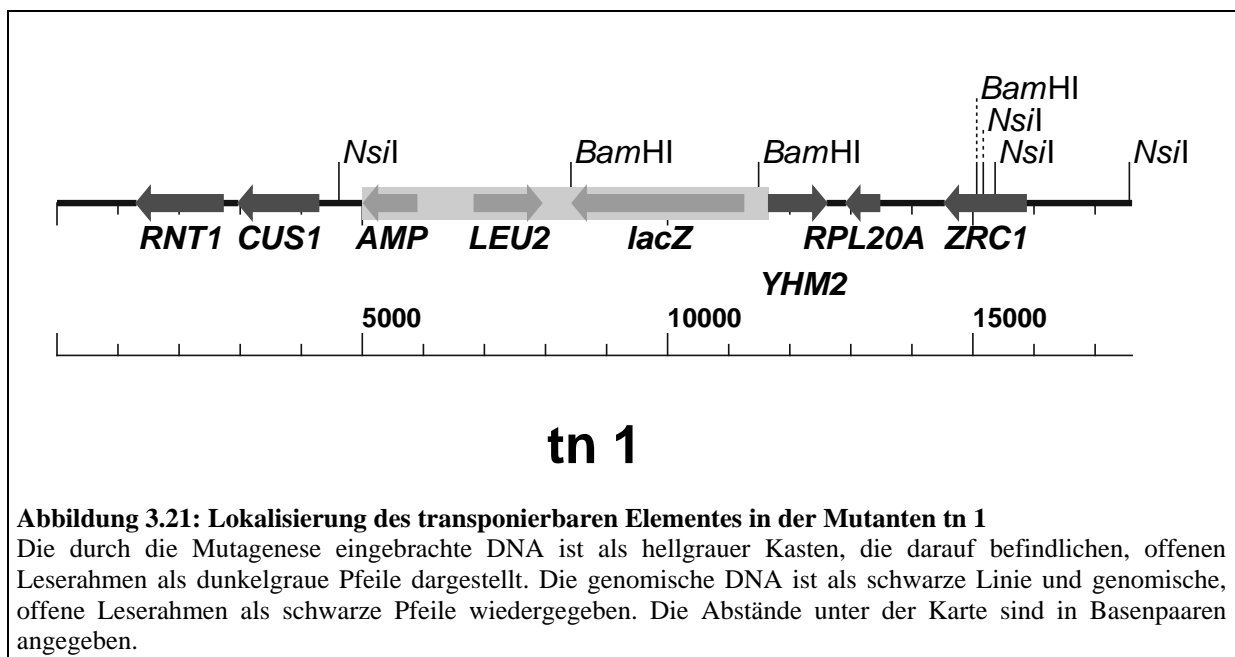
Gezeigt sind schematisch die einzelnen Schritte die zur Isolierung der Mutanten durchgeführt wurden. In den Genkarten sind genomische DNA Fragmente als Linie, genomische, offene Leserahmen als schwarze Pfeile, DNA Fragmente aus der Transposon-Genbank als hellgraue Kästen, zugehörige offene Leserahmen als dunkelgraue Pfeile, durch YIp5 eingebrachte DNA durch dunkelgraue Kästen und zugehörige offene Leserahmen durch rote Pfeile gekennzeichnet. Der mit u-200 markierte Pfeil kennzeichnet die Bindestelle des zum Sequenzieren verwendeten Oligonukleotides.

### 3.4.2 Genomische Lokalisierung der isolierten Mutanten

Im Folgenden finden sich die Genkarten der isolierten Mutanten mit jeweils ca. 10 kb flankierender Sequenzen.

#### 3.4.2.1 Die Mutante tn 1

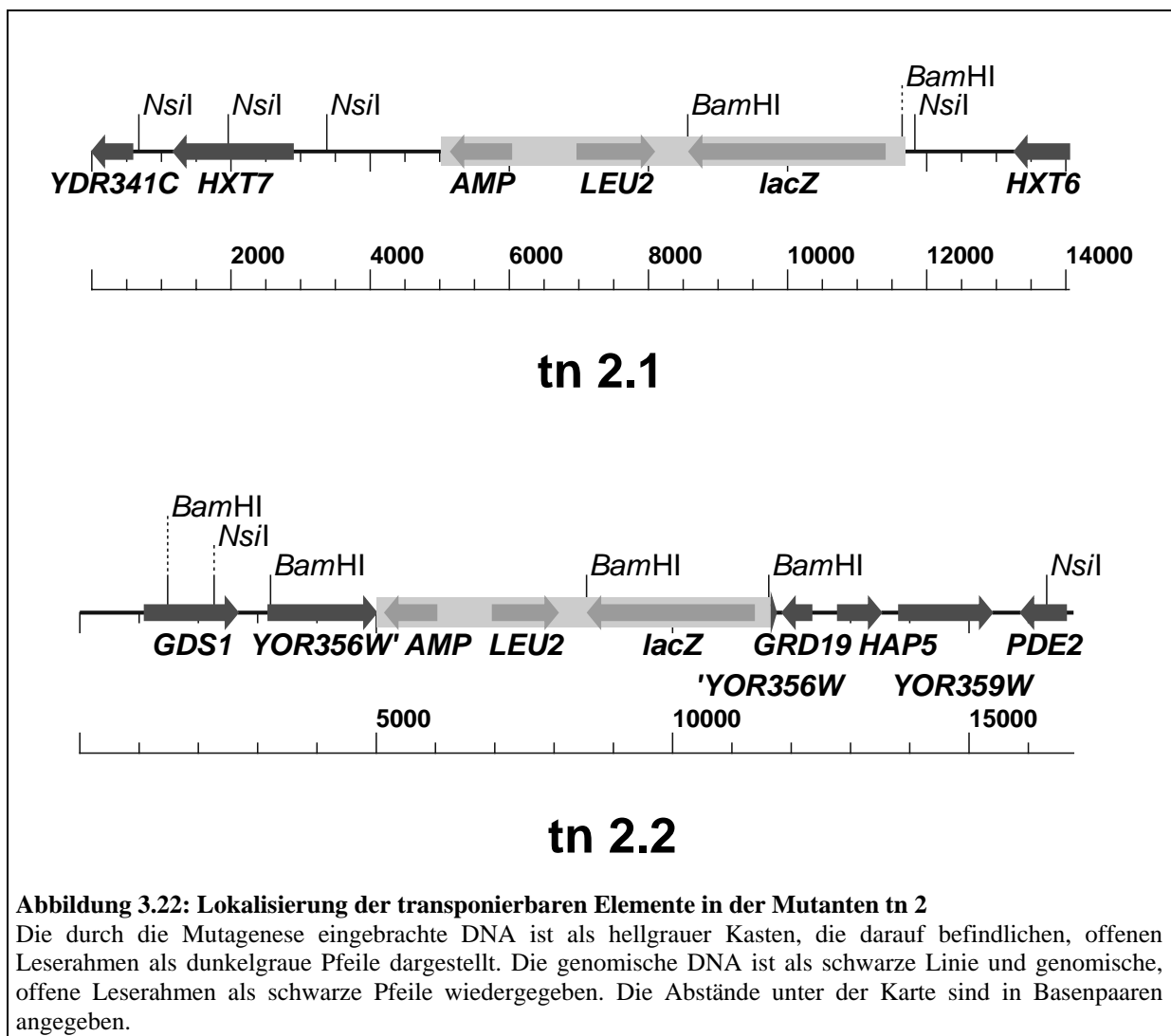
Bei der Mutante tn1 ist das transponierbare Element in Chromosom XIII zwischen die Gene *CUS1* und *YHM2* integriert (Abb. 3.21). Welche der beiden Gene für den beobachteten Anstieg der Aktivität im Pkc1p-Weg verantwortlich ist, läßt sich ohne weitere Versuche nicht bestimmen. Die Deletion von *CUS1* ist jedoch letal (Winzeler *et al.*, 1999), wodurch wahrscheinlicher ist, daß der Effekt durch den Verlust von *YHM2* hervorgerufen wird. Das Genprodukt von *YHM2* ist homolog zu Transporterproteinen in der Mitochondrienmembran (El Moulaj *et al.*, 1997) und transportiert möglicherweise Anionen, wie Citrat, alpha-Ketoglutarat oder Succinat (Mayor *et al.*, 1997). Diese mögliche Beteiligung am Ionenhaushalt der Zelle würde auch eine Änderung in der *PKC1*-Reporteraktivität sinnvoll erscheinen lassen.



#### 3.4.2.2 Die Mutante tn 2

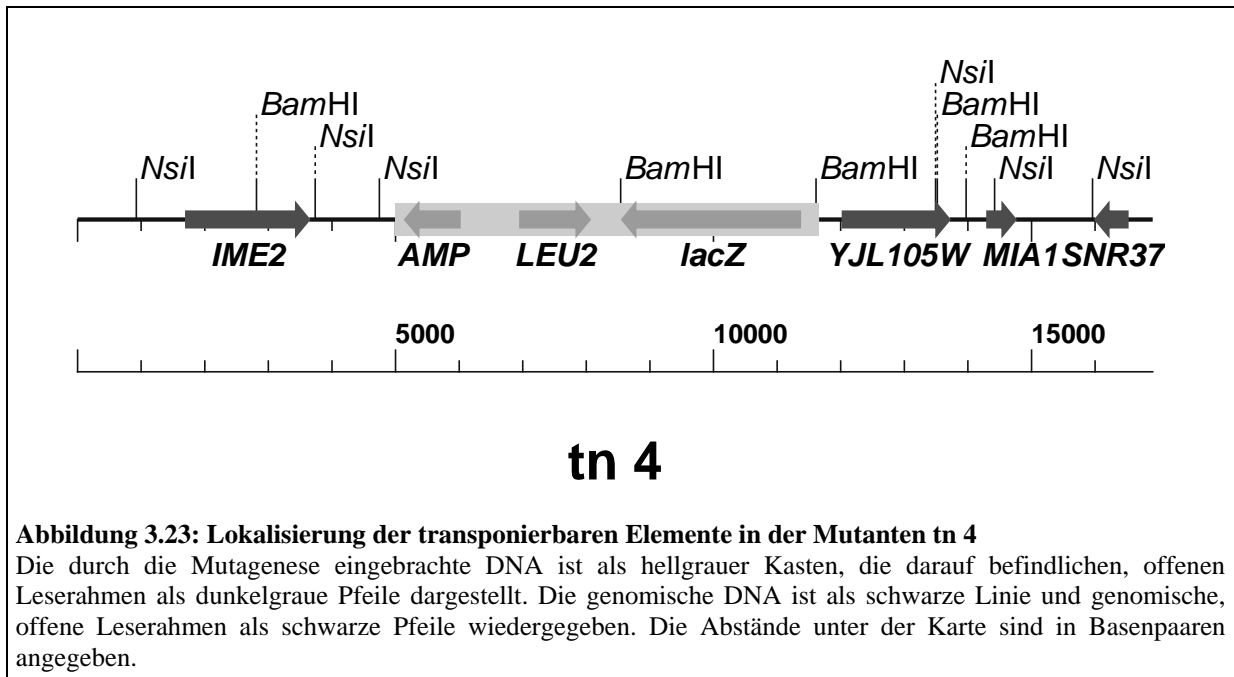
Aus der Mutante tn 2 wurden 2 verschiedene Plasmide isoliert. Das bedeutet, daß 2 Transposons in das Genom integriert waren (Abb. 3.22). Dies ist bei der verwendeten Art der Mutagenese nicht unüblich (Burns *et al.*, 1994). Das erste Transposon ist hierbei zwischen den Genen *HXT6* und *HXT7* auf Chromosom IV integriert, liegt aber mehr als 1000 bp hinter *HXT6* und mehr als 2000 bp vor dem Startcodon von *HXT7*, so daß ein Einfluß auf die

Expression der Gene nicht wahrscheinlich erscheint. Zudem findet sich das im Folgenden beschriebene Transposon auch noch in Mutante tn 27. Tn 2.1 ist also für eine erhöhte Aktivität des *PKCI*-Signaltransduktionsweges wahrscheinlich nicht verantwortlich. Das zweite aus der Mutanten tn 2 isolierte Transposon ist im offenen Leserahmen *YOR356W* auf Chromosom XV integriert. Das zum Wildtypgen zugehörige Genprodukt ist 631 Aminosäuren lang. Durch die Integration stimmt das Protein noch bis Aminosäure 606 mit der Wildtypsequenz überein, ändert sich in die Sequenz EGSDAQWNENSR und bricht dann ab. In der Mutanten ist das Protein also um 13 Aminosäuren verkürzt. Experimentelle Arbeiten zur Funktion des Genes liegen noch nicht vor. Homologievergleiche lassen auf eine Funktion des Proteins als mitochondriale Elektronen-Transfer-Flavoprotein-Ubichinon-Oxidoreduktase schließen. Dafür spricht auch, daß in dieser Proteinfamilie die katalytische Funktion am C-Terminus lokalisiert ist. Außerdem ist der Cysteinrest 606 an der Bildung des 4Fe-4S „Clusters“ beteiligt und unmittelbar neben diesem Rest bricht die Wildtypsequenz ab. Der Grund für den Einfluss auf die Pkc1p-Aktivität ist jedoch aus diesen Daten nicht direkt abzuleiten.



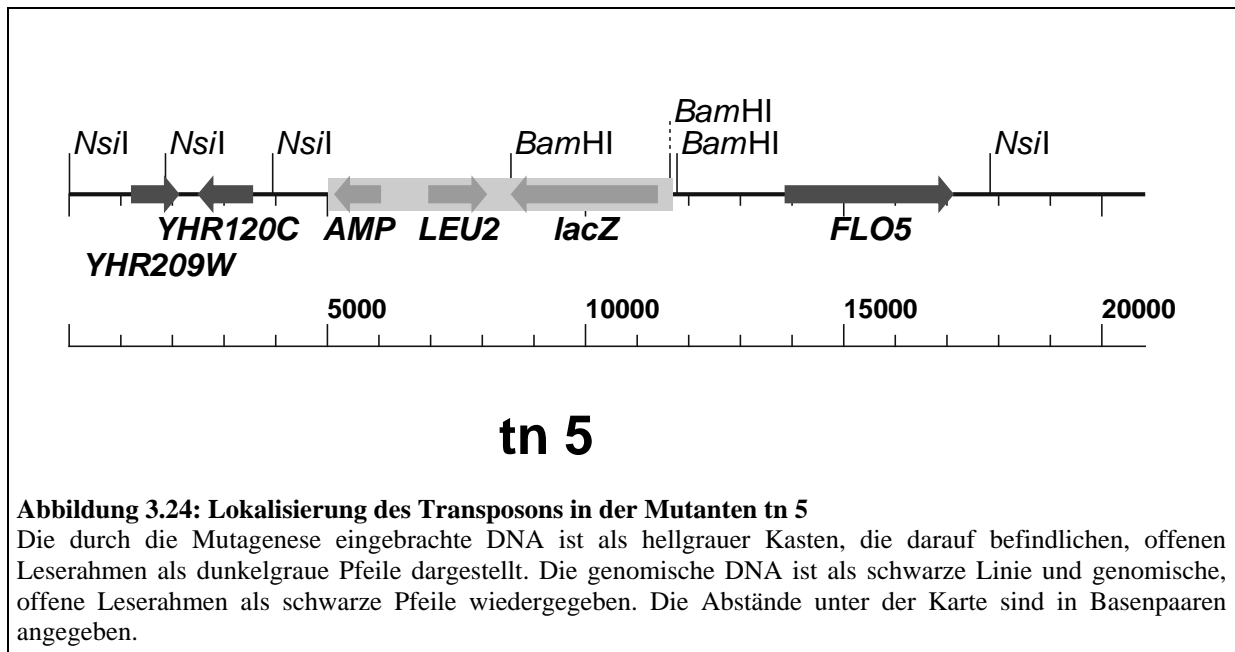
### 3.4.2.3 Die Mutante tn 4

Bei der Mutanten tn 4 ist das Transposon auf Chromosom X, 372 bp vor dem Leserahmen *YJL105W* integriert (Abb. 3.23). Auch zu diesem Gen liegen keine experimentellen Daten vor. Homologievergleiche lassen jedoch auf eine Rolle bei der transkriptionellen Regulation schließen. Auch hier existiert keine offensichtliche Begründung für die Erhöhung der Reporteraktivität.



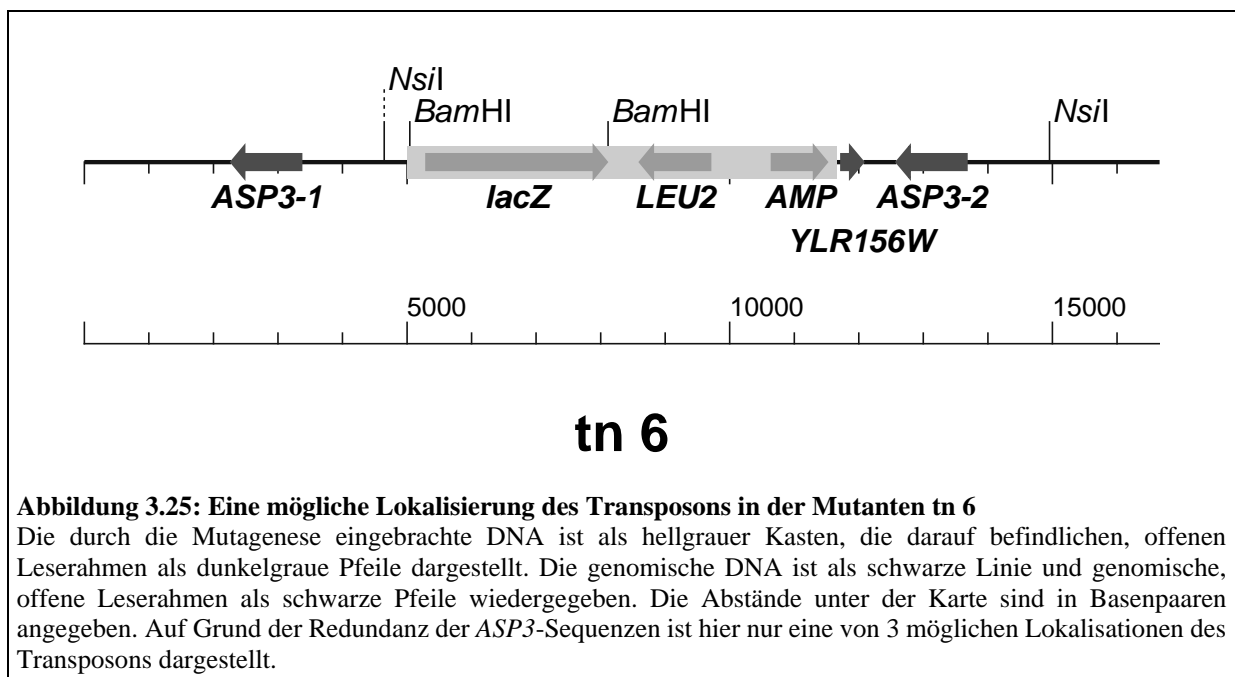
### 3.4.2.4 Die Mutante tn 5

Bei der Mutante tn 5 ist das Transposon in Chromosom VIII in die Promotorregion von *FLO5* und *YHR210C* integriert (Abb. 3.24). Auch hier muß der Beweis dafür, welches der beiden Gene für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, durch weitere Experimente erbracht werden. Über *FLO5* ist jedoch bekannt, daß es in der Zellwand am Übergang von der Mutter zur Tochterzelle und in der Tochterzelle lokalisiert ist (Bony *et al.*, 1998). Damit ist es möglicherweise an der Aufrechterhaltung der Integrität der Zellwand beteiligt, was auch den Anstieg in der PKC1p-Reporteraktivität erklären würde. Über *YHR210C* liegen keine experimentellen Daten vor, so daß eine Beteiligung an dem Herbeiführen des Phänotypes nicht ausgeschlossen werden kann.



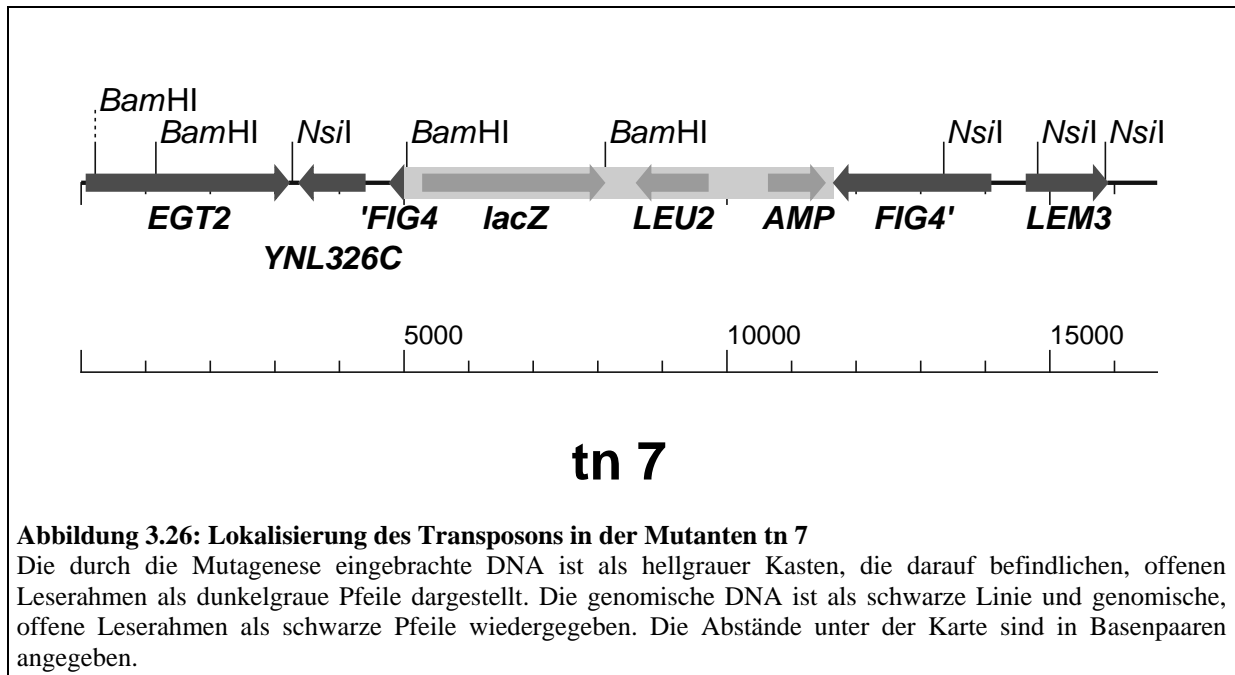
### 3.4.2.5 Die Mutante tn 6

Die Lokalisierung des Transposons in dieser Mutante ließ sich nicht eindeutig bestimmen, da die erhaltene Sequenz insgesamt viermal im Hefegenom vorhanden ist. Die möglichen Integrationsorte liegen jeweils in der Promotorregion einer der Wiederholungen der Gene *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3* und *ASP3-4* (Abb. 3.32). Das eines dieser Gene für den Phänotyp verantwortlich ist, geht aus den Mutanten tn 14, tn 15.1 und tn 16.1 hervor, bei denen das Transposon direkt in eines der oben genannten Gene integriert ist.



### 3.4.2.6 Die Mutante tn 7

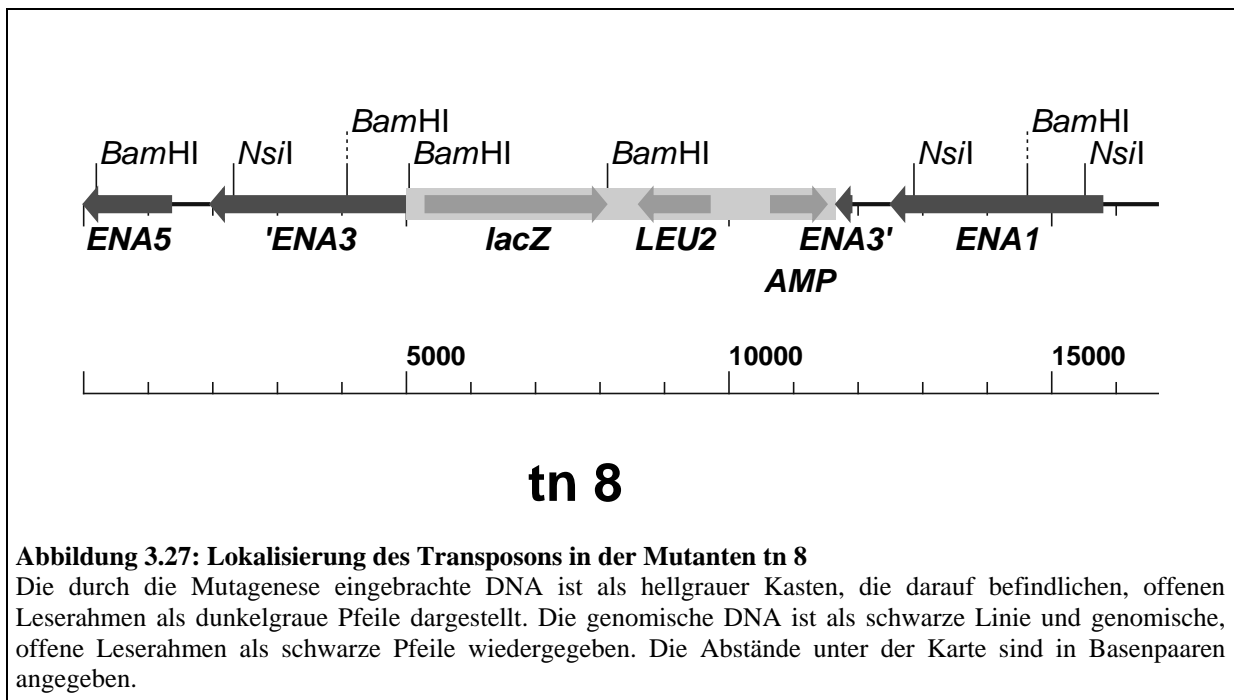
Integrationsort dieser Mutanten ist das Gen *FIG4* auf Chromosom XIV (Abb. 3.26). Durch diese Integration wird das Protein um 72 Aminosäuren am C-terminalen Ende verkürzt. Folglich muß hier ein für seine Funktion wichtiger Bereich liegen. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Protein um eine Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase (Erdman *et al.*, 1998). Die Expression des Genes wird durch Paarungspheromon induziert und Mutanten zeigen Defekte in der Ausbildung des „Shmoos“ (Erdman *et al.*, 1998). Dies zeigt schon, daß dieses Gen eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Zellform besitzt.



### 3.4.2.7 Die Mutante tn 8

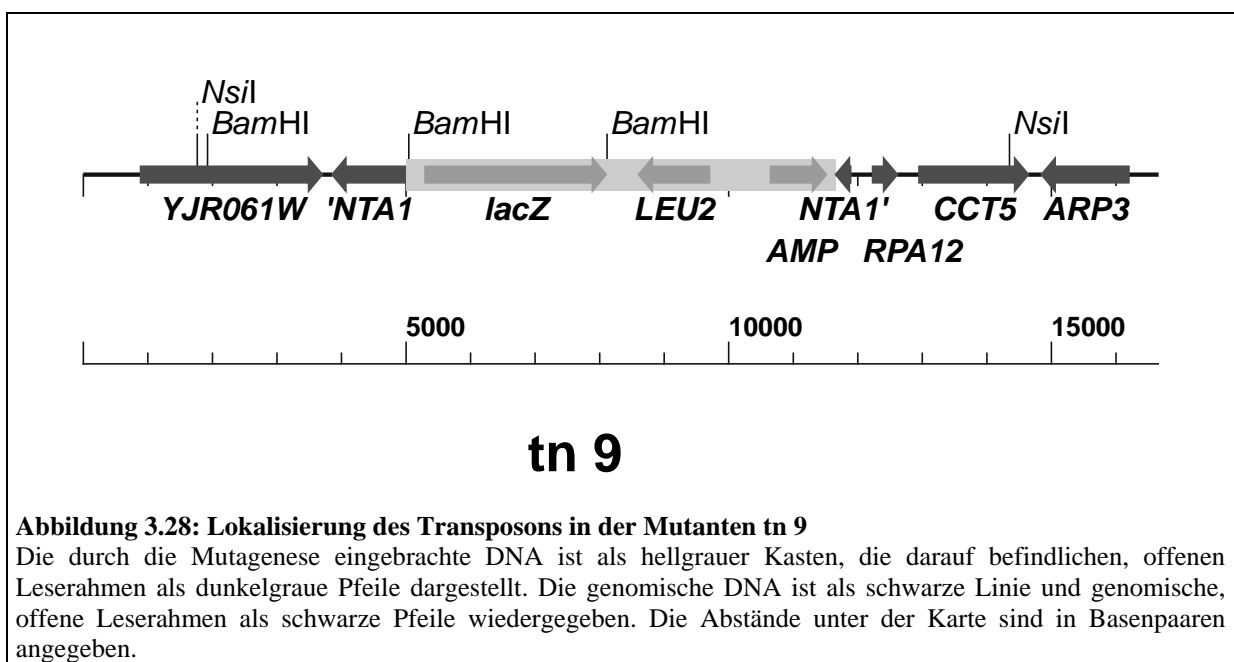
Auch in der Mutante tn 8 konnte der Integrationsort nicht eindeutig bestimmt werden. Mit Sicherheit liegt der Integrationsort auf Chromosom IV in einem Bereich mit 3 fast zu 100% identischen Genen *ENA1*, *ENA3* und *ENA5* (Abb. 3.27). *ENA1* unterscheidet sich in dem sequenzierten Bereich in einigen, wenigen Resten von *ENA3* und *ENA5* weshalb *ENA1* als Integrationsort ausgeschlossen werden kann. Alle drei Genprodukte sind jedoch Natrium ATPasen, die Ionen aus der Zelle transportieren (Wieland *et al.*, 1995) wodurch es zellintern zu einer höheren Ionenkonzentration als im umgebenden Medium kommt, was wiederum zur Aktivierung des Pkc1p-Weges führen könnte.





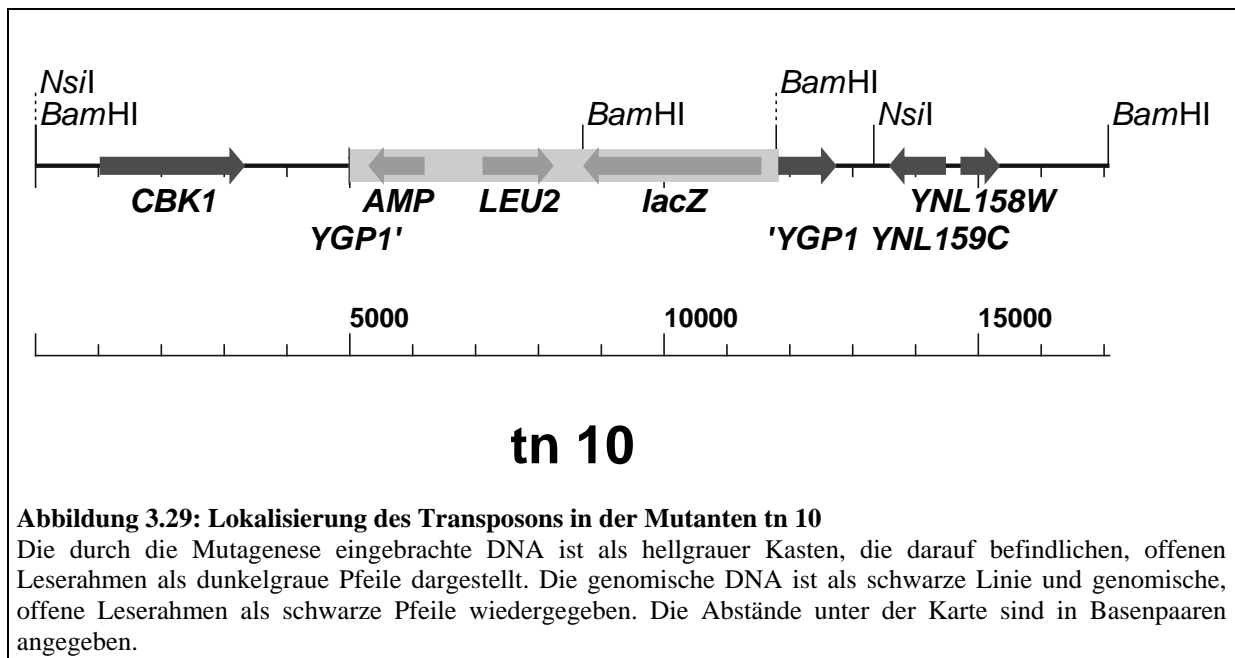
### 3.4.2.8 Die Mutante tn 9

Hier erfolgte die Integration in Chromosom X in dem Gen *NTA1* (Abb. 3.28). Dadurch verbleibt ein Bereich, der für 75 Aminosäuren des Wildtyp-Proteines kodiert. Durch die Integration werden hieran weitere 17 Aminosäuren (DRGLTSLSGTKTHVKGFW) fusioniert. Das Wildtyp-Protein besitzt demgegenüber eine Länge von 457 Aminosäuren. *NTA1* ist eine aminoterminal Amidase, die aminoterminal Asparagin- und Glutamin-Reste von Proteinen deamidiert (Baker und Varshavsky, 1995). Diese werden dann über den „N-end rule“-Weg abgebaut. Die Deletion wirkt also auf Proteine, die solchermaßen abgebaut werden stabilisierend.



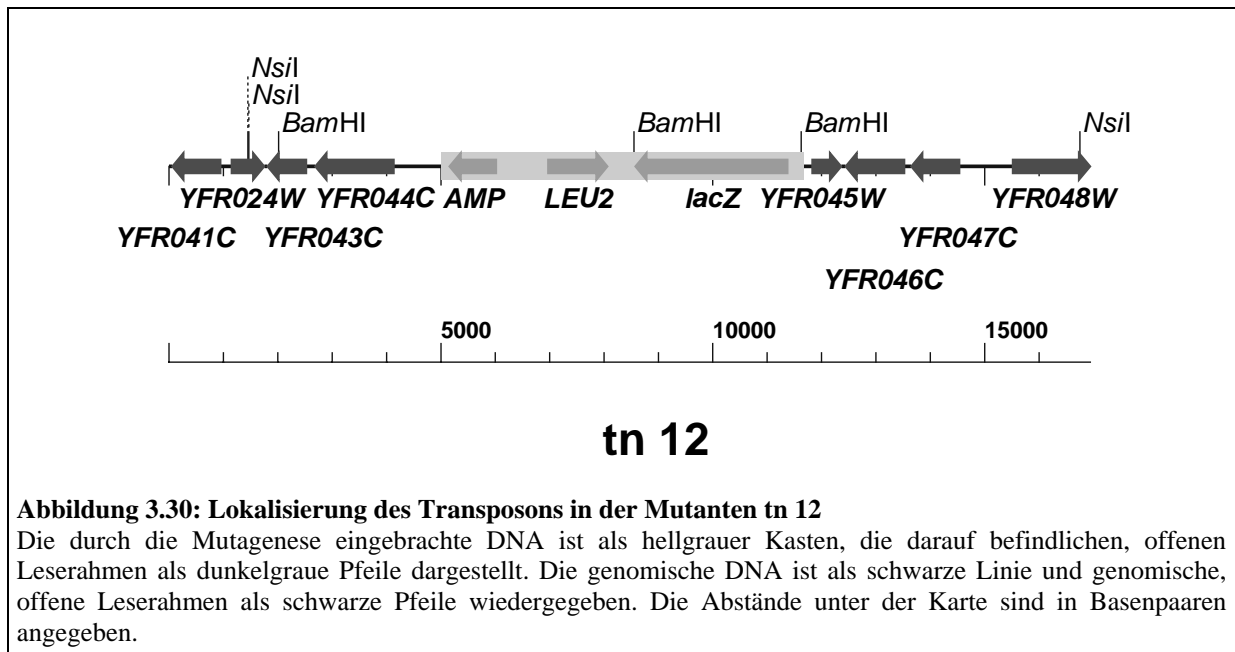
### 3.4.2.9 Die Mutante tn 10

Bei der Mutanten tn 10 sitzt das Transposon in Chromosom XIV in dem Gen *YGP1* (Abb. 3.29). Durch die Integration wird das Genprodukt von 354 auf 57 Aminosäuren verkürzt. Zusätzlich zu diesen 57 Aminosäuren des Wildtyp-Proteines kommen durch die Integration die Aminosäuren AGSDAQWNENSR bevor ein Stopcodon folgt. Das Wildtyp-Protein ist hochglykosyliert und wird sekretiert (Destruelle *et al.*, 1994). Die Sequenz deutet darauf hin, dass es sich um eine Asparaginase handelt. Diese Enzymklasse katalysiert die Deamination von Asparagin zu Asparaginsäure und einem Ammoniumion. Somit hat dieses Enzym möglicherweise einen Einfluß auf die extrazelluläre Ionenkonzentration, was die Aktivierung des *Pkc1p*-Weges in der Mutanten erklären würde.



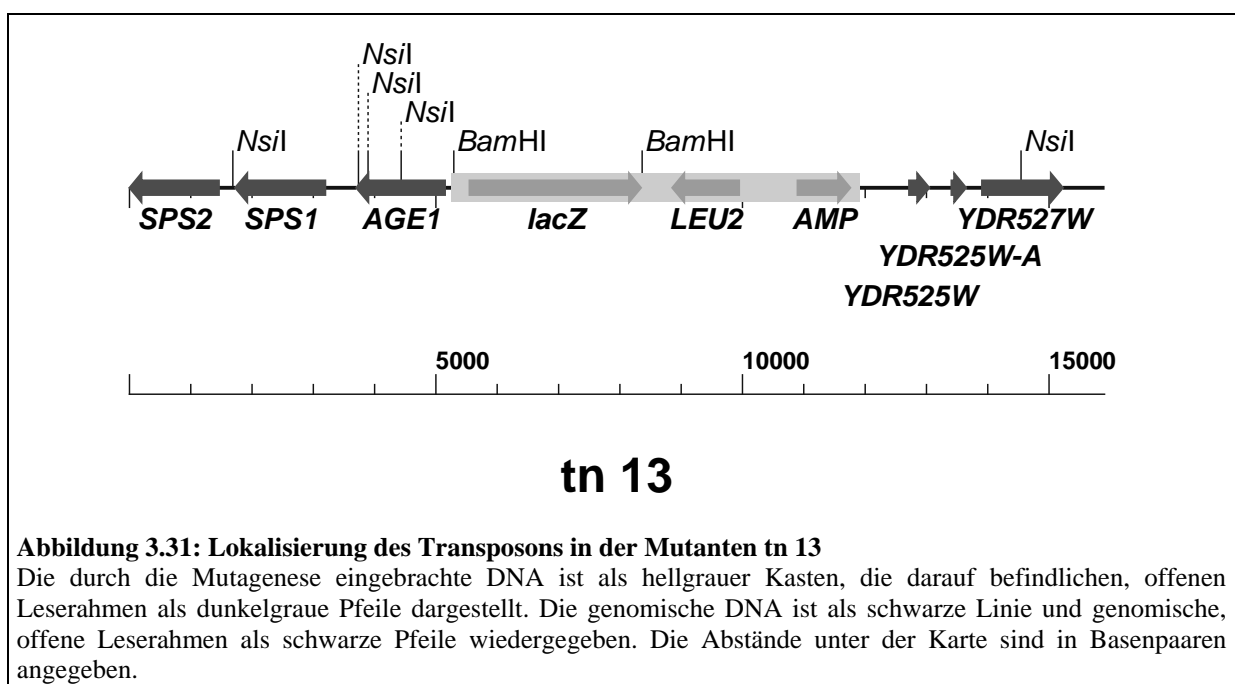
### 3.4.2.10 Die Mutante tn 12

Die Integration des Transposons erfolgte bei dieser Mutanten in Chromosom VI 154 Basenpaare vor dem offenen Leserahmen *YFR045W* (Abb. 3.30). Das Genprodukt läßt sich auf Grund von Homologievergleichen wie schon die Mutante tn 1 in Abschnitt 3.4.2.1 der Familie mitochondrialer Transporter zuordnen (El Moulaj *et al.*, 1997).



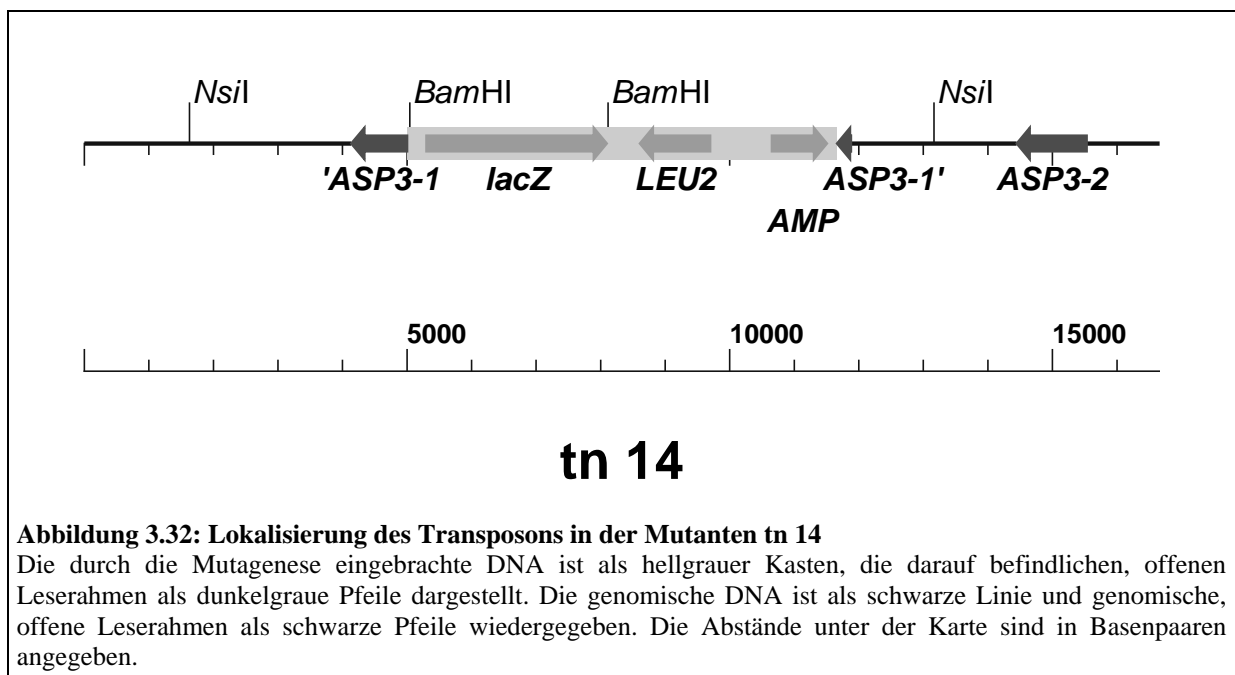
#### 3.4.2.11 Die Mutante tn 13

Die Mutante tn 13 trägt die Integration des Transposons in Chromosom IV 102 Basenpaare vor dem Gen *AGE1* (Abb. 3.31). Eine Sequenzanalyse des zugehörigen Proteins mit dem Programm SMART (Schultz *et al.*, 1998) zeigt, daß das Protein eine „ARF-GAP“ Domäne besitzt. Adenosyl-Ribosylierungs-Faktoren sind GTP-bindende Proteine, die am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind. Die intrinsische GTPase-Aktivität dieser Proteine wird durch GTPase Aktivierende Proteine aktiviert (Vitale *et al.*, 1998). Da dieser Vesikeltransport wichtig für die Zellwandsynthese ist, ist die Erhöhung der *PKC1* Reporteraktivität erklärbar.



### 3.4.2.12 Die Mutante tn 14

In der Mutanten tn 14 ist das Transposon in Chromosom XII in eines der Gene *ASP3-1*, *ASP3-2*, *ASP3-3*, *ASP3-4* integriert (Abb. 3.32). Dadurch wird das Protein von 362 Aminosäuren auf 76 Aminosäuren verkürzt, wovon nur 74 Aminosäuren der Wildtypsequenz entsprechen und zusätzlich die Aminosäuren GV angehängt werden. Wie schon bei der Mutanten tn 10 in Abschnitt 3.4.2.9 handelt es sich bei dem Enzym um eine Asparaginase, so daß bezüglich der Pkc1p-Aktivität auch hier eine Regulation über die extrazelluläre Ionenkonzentration möglich wäre.



### 3.4.2.13 Die Mutante tn 15

Diese Mutante gehört ebenfalls zu der Gruppe bei der zwei verschiedene Integrationen des Transposons nachgewiesen werden konnten. Beide Integrationen sind identisch mit den schon weiter oben beschriebenen in Abschnitt 3.4.2.1 bei Mutante tn 1 (Gen *YHM2*) und in Abschnitt 3.4.2.12 bei Mutante tn 14 (Gen *ASP3*).

### 3.4.2.14 Die Mutante tn 16

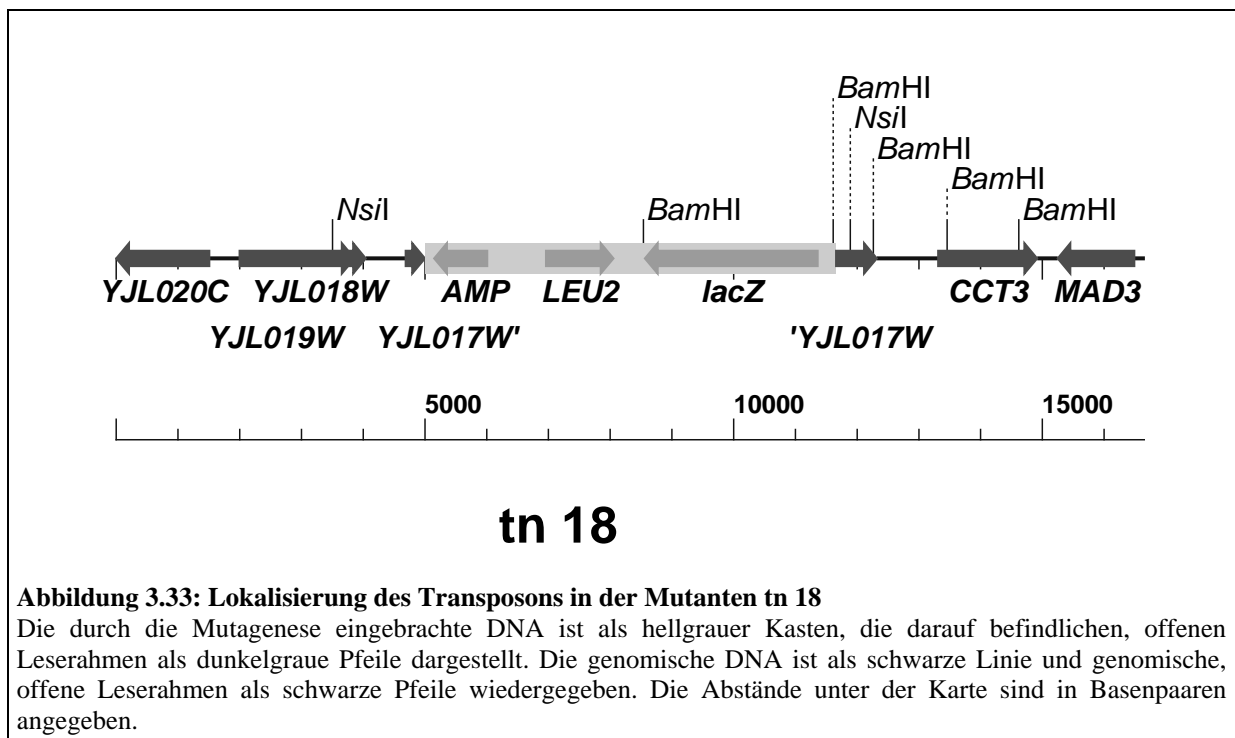
Hier gilt dasselbe wie im vorigen Abschnitt. Die hier isolierten Fragmente ergaben eine Integration des Transposons, die einmal identisch ist mit der in Abschnitt 3.4.2.1 bei Mutante tn 1 (Gen *YHM2*) und zum anderen mit der in Abschnitt 3.4.2.7 bei Mutante tn 8 (*ENA2* oder *ENA5*).

### 3.4.2.15 Die Mutante tn 17

Die Mutante tn 17 ist identisch mit der in Abschnitt 3.4.2.1 beschriebenen Mutanten tn 1 (Gen *YHM2*).

### 3.4.2.16 Die Mutante tn 18

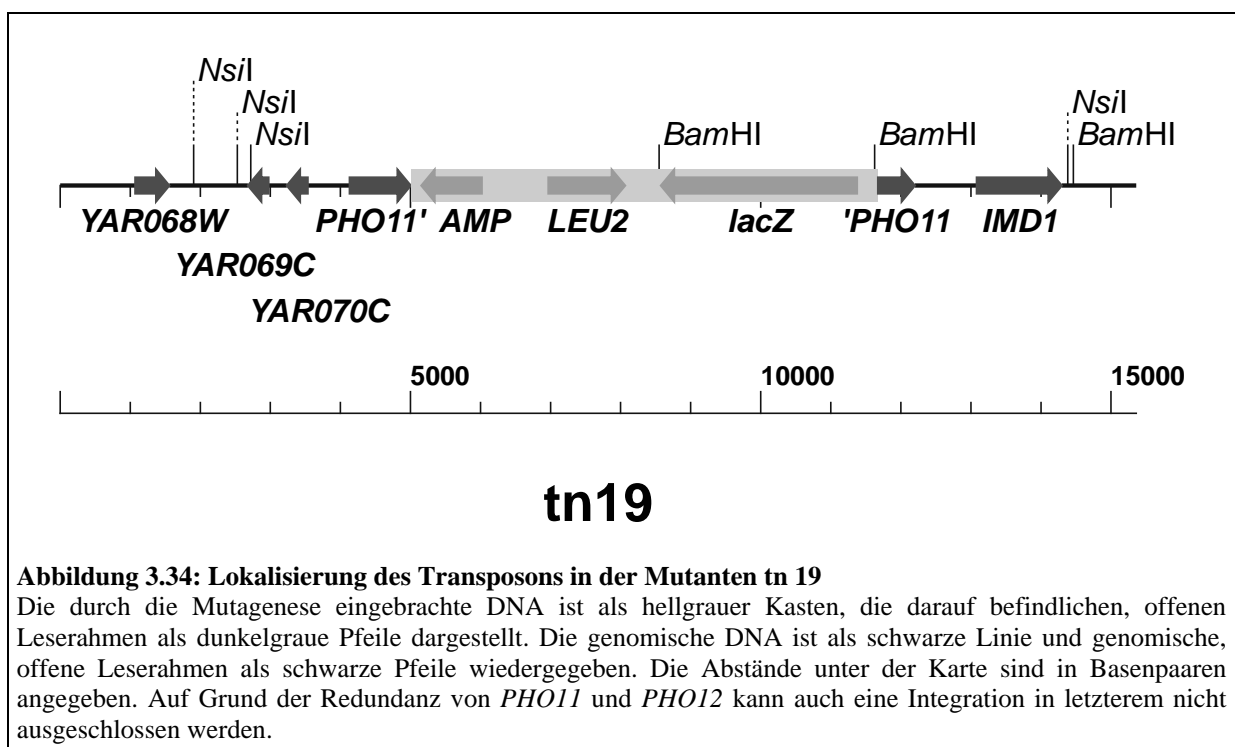
Die Mutante tn 18 trägt ein Transposon im offenen Leseraster *YJL107W* auf Chromosom X (Abb. 3.33). Die Integration führt zu einer Verkürzung des Proteins von 325 auf 108 Aminosäuren. Zusätzlich wird an diese 108 Aminosäuren noch die Sequenz AQWNENSR angehängt, so daß das resultierende Protein 116 Aminosäuren lang ist. Über die Funktion des Genproduktes liegen keine Erkenntnisse vor. Eine Deletion des Genes zeigte keine Phänotypen (Esser *et al.*, 1999). Eine Analyse der Sequenz mit BLAST (Altschul *et al.*, 1990), SMART (Schultz *et al.*, 1998) und PROSITE (Hofmann *et al.*, 1999) ergab keine Hinweise auf eine Funktion oder funktionelle Domänen.



### 3.4.2.17 Die Mutante tn 19

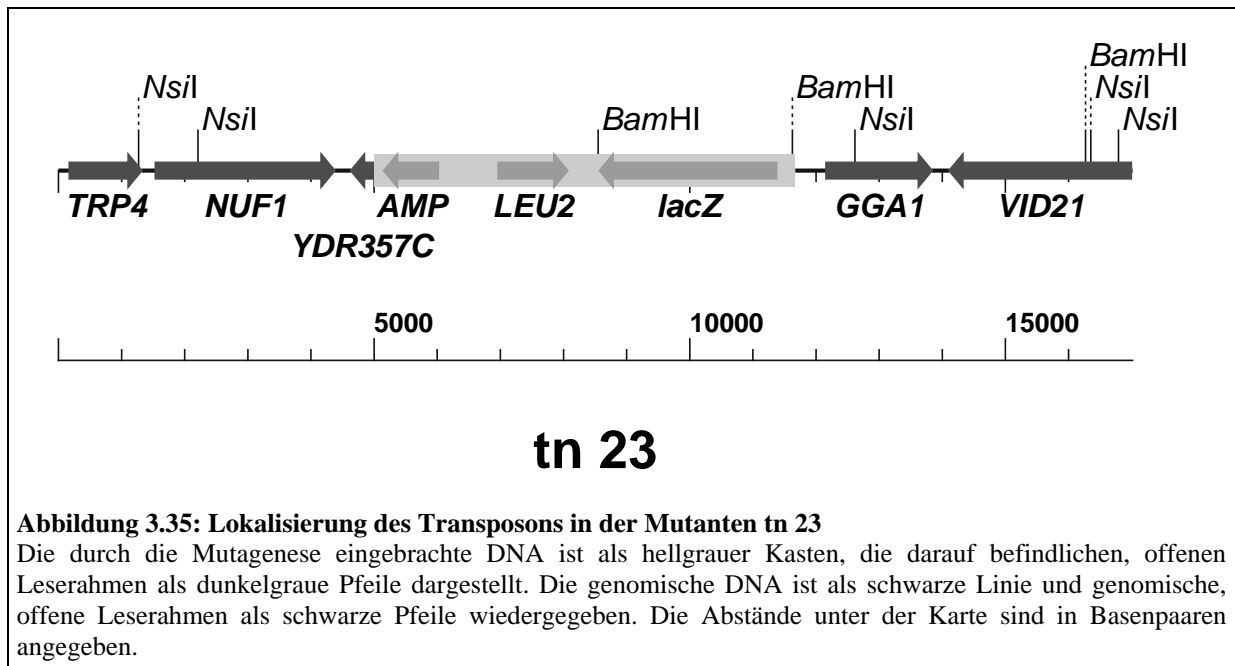
Bei der Mutanten tn 19 kann erneut nicht mit Sicherheit die Lokalisierung des Transposons nachgewiesen werden. Es sitzt entweder in Chromosom I im Gen *PHO11* oder in Chromosom VIII im Gen *PHO12* (Abb. 3.34). Beide Gene sind identisch. Durch die Integration kommt es

in einem der beiden Proteine zu einer Verkürzung von 467 auf 291 Aminosäuren und zusätzlich wird die Sequenz GGLTSLSGTKTHVKGFWWS angehängt. Bei dem Protein handelt es sich um eine Untereinheit einer in den periplasmatischen Raum sekretierten, sauren Phosphatase (de Steensma *et al.*, 1989). Diese Proteine besitzen konservierte Histidinreste im Amino- und im Carboxy-Terminus, die wichtig für die katalytische Funktion sind (Ostanin *et al.*, 1992). In Pho11p und Pho12p liegt ein solcher Rest an Position 327. Durch die Disruption fehlt dieser Rest und das Enzym kann seine katalytische Funktion nicht mehr erfüllen. Diese Funktion ist offensichtlich von Bedeutung für die Integrität der Zellwand, so daß es bei Funktionsverlust, wie beobachtet, zu einem Anstieg in der Pkc1p-Aktivität kommt. In Abbildung 3.34 ist beispielhaft die Integration in *PHO11* gezeigt.



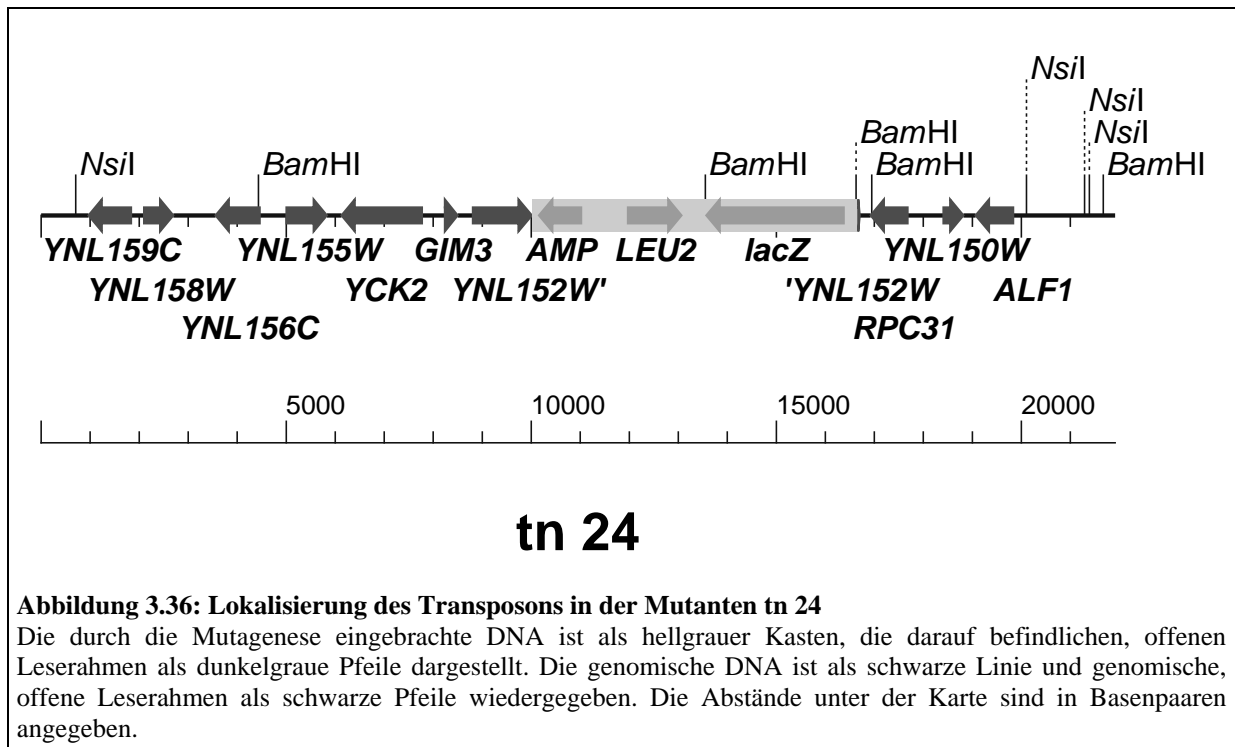
#### 3.4.2.18 Die Mutante tn 23

In dieser Mutanten ist das Transposon in Chromosom IV in den Promotorbereich von *YDR357C* und *GGA1* integriert (Abb. 3.35). Die Expression welches der beiden Gene dadurch beeinflusst wird, geht aus den durchgeführten Experimenten nicht hervor. Über *YDR357C* ist lediglich bekannt, daß sein Genprodukt mit Smx3p, einem Kernprotein des „Spliceosoms“ interagiert (Uetz *et al.*, 2000). *GGA1* ist ein im Golgi-Apparat lokalisiertes ARF-bindendes Protein (Lemmon und Traub, 2000).



#### 3.4.2.19 Die Mutante tn 24

Bei der Mutanten tn 24 ist das Transposon XIV in das Gen *YNL152W* integriert (Abb. 3.36). Bei dem zugehörigen Protein werden durch diese Integration die C-terminalen 8 Aminosäuren durch die Sequenz GLTSLGTHKTHVKGFWFS ersetzt. Über die Funktion des Proteins liegen keine Erkenntnisse vor. Die Deletion des kompletten Genes ist allerdings letal (Winzeler *et al.*, 1999). Die geringfügigen Änderungen durch die Integration an der Gesamtsequenz lassen also auf eine Bedeutung des C-terminalen Endes für die Funktion des Proteins schließen. Eine Analyse der Sequenz mit BLAST (Altschul *et al.*, 1990), SMART (Schultz *et al.*, 1998) und PROSITE (Hofmann *et al.*, 1999) ergab keine jedoch keine Hinweise auf eine Funktion oder die Existenz funktioneller Domänen.



#### 3.4.2.20 Die Mutante tn 27

Die Mutante tn 27 trägt das Transposon wie schon die Mutante tn 2 in Abschnitt 3.4.2.2. Da der Integrationsort identisch ist wird hier lediglich an diese Stelle verwiesen.



### 3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.4.2

In der folgenden Tabelle sind die isolierten Gene und, falls bekannt, die Funktion ihrer Genprodukte noch einmal zusammengefaßt.

Gen	Häufigkeit	Integrationsort	Funktion des Genprodukts
<i>YHM2</i>	4	Gen, Promotor	mitochondrialer Transporter, Anionentransport
<i>YOR356W</i>	2	Gen	Elektronen-Transfer-Flavoprotein-Ubichinon Oxidoreduktase
<i>YJL105W</i>	1	Promotor	unbekannt
<i>YHR120C, FLO5</i>	1	Promotor	unbekannt, Zellwandprotein - Flokkulation
<i>ASP3</i>	3	Gen, Promotor	sekretierte Zellwand Asparaginase
<i>FIG4</i>	1	Gen	Inositol Polyphosphat-5-Phosphatase
<i>ENA3, ENA5</i>	2	Gen	Natrium ATPasen, Export von Ionen
<i>NTA1</i>	1	Gen	N-terminale Amidase, Deamidation von ASN und GLN
<i>YGP1</i>	1	Promotor	sekretierte Zellwand Asparaginase
<i>YFR045W</i>	1	Promotor	mitochondrialer Transporter
<i>AGE1</i>	1	Promotor	möglicher ARF-GAP, Vesikeltransport
<i>YJL017W</i>	1	Gen	unbekannt
<i>PHO11, PHO12</i>	1	Gen	sekretierte, saure Phosphatase
<i>GGA1, YDR357C</i>	1	Promotor	unbekannt (YDR357C) / ARF-bindendes Protein (GGA1)
<i>YNL152W</i>	1	Gen	unbekannt

**Tabelle 3.1: Übersicht über die isolierten Gene mit Beteiligung an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität**

Aufgeführt sind der Genname, die Anzahl der isolierten Mutanten mit Integrationen in diesem Gen oder der zugehörigen Promotorregion, der Ort der Integration und, falls bekannt, die mögliche Funktion des Genes.

## 4. Diskussion

Wie in der Einleitung geschildert, spielen die Enzyme der Proteinkinase C „Superfamilie“ eine wichtige Rolle in verschiedensten Signaltransduktionswegen. Für die Regulation dieser Proteine spielen konservierte Bereiche, also Domänen, eine wichtige Rolle. Zwei Faktoren erschweren dabei die Aufklärung der Funktion der einzelnen Proteine. Zum einen die Vielzahl von Isoenzymen, die in höheren Zellen existieren, zum anderen die Tatsache, daß sich offensichtlich die Regulation an homologen Domänen bei verschiedenen Proteinen und Organismen deutlich voneinander unterscheiden kann und so nicht einfach von einem Enzym auf das andere übertragbar ist. Diese Probleme wurden in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung des einzelligen Eukaryonten *S. cerevisiae* als Modellorganismus umgangen. Dieser verfügt nur über ein Proteinkinase C-Homologes, welches zudem als ursprüngliche Form der Enzymklasse betrachtet wird (Mellor und Parker, 1998). Es besitzt jedoch alle Charakteristika und auch die konservierten Domänen, die in den homologen Proteinen höherer Organismen vorhanden sind. Durch Einsatz der gut etablierten Genetik und Biochemie von *S. cerevisiae* sollten in dieser Arbeit drei wesentliche Bereiche untersucht werden. Die ersten beiden Bereiche umfassen dabei die Untersuchung der Regulation von Pkc1p durch zwei verschiedene Domänen.

Für die erste der beiden Domänen, die C1-Domäne, sollte unter anderem, durch die Herstellung chimärer Proteine von Pkc1p mit den C1-Domänen aus anderen Kinasen, geklärt werden, wie diese Domänen im allgemeinen reguliert werden und in welche funktionelle Gruppe die Domäne von Pkc1p aus *S. cerevisiae* eingeordnet werden kann. Der zweite Bereich von Pkc1p der im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, war der aminoternale Bereich, der, wie man heute weiß, eine HR1-Domäne trägt und für den in Pkc1p von *S. cerevisiae* keine Funktion bekannt war. Der dritte Teil dieser Arbeit entfernt sich ein wenig von Struktur und Funktion des Proteins Pkc1p und dient der Aufklärung des genetischen Umfeldes, das daran beteiligt ist, den Pkc1p-vermittelten Signaltransduktionsweg in seinem inaktiven Zustand zu halten.

## 4.1 Die Regulation von Pkc1p an der C1 Domäne

### 4.1.1 An der Regulation von Pkc1p an der C1 Domäne ist Rho1p beteiligt

Als Ausgangspunkt für die hier durchgeführten Untersuchungen diente eine Mutante von Pkc1p, bei der homologe Reste mutiert wurden, die in den Säugerenzymen für die Bindung von Zink verantwortlich sind (Jacoby *et al.*, 1997). Diese Mutanten zeigten Wachstumsdefekte auf Medien mit „Calcofluor white“, Koffein und SDS. Es konnte bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden, worauf diese Phänotypen zurückzuführen sind. Nonaka *et al.* (1995) konnten für ein Fragment von Pkc1p, welches auch die C1-Domäne enthielt, eine Interaktion mit einem daueraktiven Rho1p nachweisen. Aus diesem Grund wurde hier zunächst untersucht, ob in der C1-Mutanten von Pkc1p diese Interaktion verändert wird. Die durchgeführten „Dihybrid“ Untersuchungen (Abbildung 3.1) ergaben, daß die Stärke der Interaktion zwischen einem aktiven Rho1p und der Pkc1p-Varianten auf ca. zwei Drittel des Wildtypwertes zurückgeht. Dies legt nahe, daß die bei der Mutanten beobachteten Wachstumsdefekte auf diesen Rückgang der Interaktion zurückzuführen sind. Sollte dieser Rückgang auch *in vivo* vorhanden sein, müßte man auch eine Änderung in der Lokalisation von Pkc1p postulieren, da diese, wie von Andrews und Stark (2000) gezeigt, abhängig von Rho1p ist. In der Tat zeigt ein, an GFP fusioniertes, mutiertes Pkc1p einen Verlust der Polarität verglichen mit der Fusion des Wildtypenzym (Abbildung 3.2). Gleichzeitig ist bei dem mutierten Allel eine deutliche Zunahme der Signalstärke zu beobachten, die auf eine Erhöhung der Proteinmenge von Pkc1p zur Kompensation des Funktionsverlustes hindeutet. Dies könnte durch Transkriptions-Analysen belegt werden, die aber aus Zeitgründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten. Wie daran anschließende *in vitro* Kinasetests zeigten (Abschnitt 3.1.1.2), ist in der Mutanten tatsächlich nur die Aktivierung des Enzymes gestört. Wildtyp und Mutanten Pkc1p zeigen die gleiche Basalaktivität. Anders gestaltet sich das Bild bei Messung der *in vivo* Aktivität (Abbildung 3.4) mit einem indirekten Reportersystem. Hier geht die gemessene Aktivität in der Mutanten auf ungefähr ein Drittel des Ausgangswertes zurück. Da hier die Aktivierbarkeit des Enzymes eine entscheidende Rolle spielt, kann man davon ausgehen, daß diese in der Mutanten nicht mehr in dem gleichen Umfang gegeben ist, wie beim Wildtyp. Obwohl die Interaktion von Pkc1p mit Rho1p schon von Nonaka *et al.* (1995) und die Aktivierbarkeit von Pkc1p durch Rho1p von Kamada *et al.* (1996) gezeigt werden konnten,

fehlten bislang Beweise dafür, daß diese Aktivierung tatsächlich durch die Interaktion von Rho1p mit der C1-Domäne von Pkc1p vermittelt wird. Diese werden erstmals durch die oben aufgeführten Ergebnisse dieser Arbeit geliefert. Durch diese Ergebnisse konnte allerdings die Frage nicht geklärt werden, warum Proteinkinase C-Enzyme zwei C1 Motive besitzen. Diese ergibt sich unter anderem aus den Ergebnissen struktureller Untersuchungen, die zeigten, daß zur Bindung eines aktivierenden Moleküls eine Wiederholung des C1 Motives ausreichend ist (Zhang *et al.*, 1995). Da bei der hier untersuchten Mutanten sowohl C1A als auch C1B mutiert waren, war nach wie vor nicht klar, ob eventuell eine der beiden Wiederholungen neben Rho1p noch einen anderen Aktivator binden kann. Hinweise darauf ergaben sich aus mehreren Arbeiten, die eine Aktivierung von Pkc1p durch Derivate des Lipidstoffwechsels nahelegen. So wird der „hyperrekombinative“ Phänotyp von *pkc1*-Mutanten in der Kinasedomäne durch die Deletion des Genes *kcs1* komplementiert. (Huang und Symington, 1995). Kcs1p ist eine Inositol-Polyphosphat-Kinase und phosphoryliert in erster Linie Inositol-(1,2,3,4,5,6)-Phosphat zu Diphosphoinositol-Pentakiphosphat (Saiardi *et al.*, 1999). Ein weiteres Gen, das in diesem Zusammenhang genannt werden muß, ist *STT4*. Das zugehörige Protein ist eine Phosphatidylinositol-(4)-Kinase. Die Staurosporinsensitivität von *stt4*-Mutanten kann durch Überexpression von *PKC1* aufgehoben werden, weshalb man Stt4p eine Funktion oberhalb von Pkc1p zuschreibt (Yoshida *et al.*, 1994). Das letzte bislang bekannte Protein in dieser Gruppe ist Mss4p eine Phosphatidylinositol-(4)-Phosphat-(5)-Kinase (Desrivieres *et al.*, 1998). Auch die Funktion dieses Proteins wurde oberhalb von Pkc1p eingeordnet, da die Gene beider Proteine Mutanten von *tor2* komplementieren und die Überproduktion von *MSS4* Mutanten von *stt4* komplementiert (Desrivieres *et al.*, 1998). Somit finden sich mehrere Proteine des Lipidmetabolismus, die Funktionen oberhalb von Pkc1p besitzen. Möglicherweise bindet das Substrat oder Produkt eines dieser Enzyme an die C1-Domäne von Pkc1p und ist somit an der Regulation beteiligt. Zusätzlich würde dies bedeuten, daß die Bindung von Rho1p nur mit einem Teil der C1-Domäne erfolgt. Dies wurde hier durch die Herstellung weiterer Mutanten in den einzelnen Wiederholungen der C1-Domäne näher untersucht.

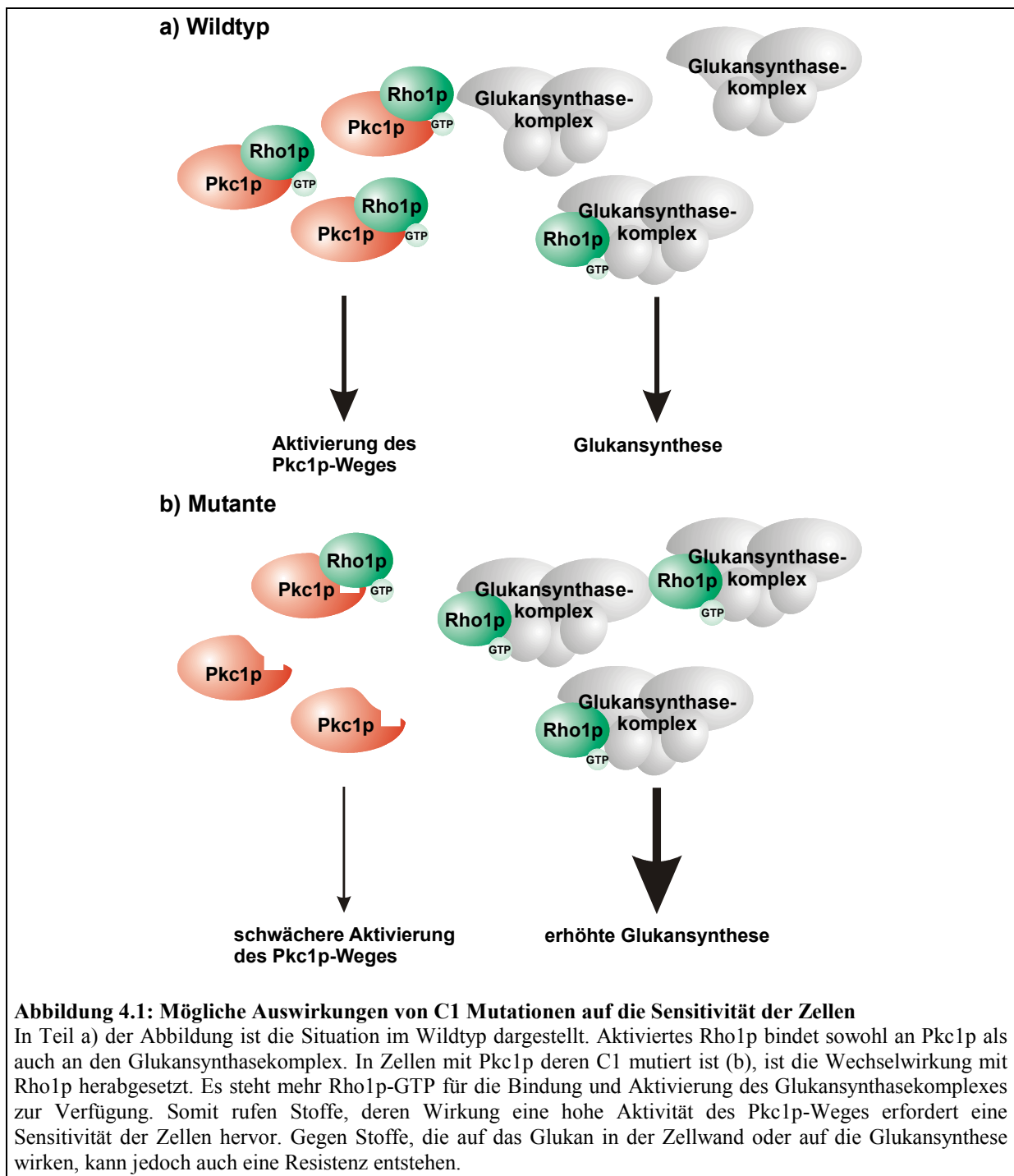
#### 4.1.2 Unterschiede in der Regulation von Pkc1p an C1A und C1B

Erste Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation an C1A und C1B ergaben sich bei Mutanten, bei denen jeweils eine Wiederholung des C1-Motives aus Pkc1p deletiert wurde (Abbildung 3.5). So sind Mutanten bei Deletion von C1A kaum sensitiv gegenüber Koffein aber sensitiv gegenüber „Calcofluor white“ während Mutanten bei Deletion von C1B kaum sensitiv gegenüber „Calcofluor white“ aber sensitiv gegenüber Koffein sind. Beide Mutanten

wachsen jedoch nicht in Gegenwart von Kongorot. Das gleiche gilt im Wesentlichen auch für Mutanten, die keine Deletion des jeweiligen C1-Motives, sondern nur Punktmutationen, entsprechend der zuvor untersuchten Doppelmutanten (Jacoby *et al.*, 1997) trugen. Im Unterschied zur Deletion ist die Punktmutation in C1A (C<sub>434,437</sub>S) jedoch sensitiver gegen über Koffein (Abbildung 3.6). Punktmutanten in C1B (C<sub>514,517</sub>S) sind jedoch, genau wie die Deletion, nicht sensitiv gegenüber „Calcofluor white“. Für ein Verständnis der beobachteten Phänotypen muß zunächst einmal der Wirkmechanismus der einzelnen Substanzen in Betracht gezogen werden. Für Kongorot wurde eine Wirkung vornehmlich auf die Synthese von  $\beta$  (1-3)-D-Glukan (Kopecka und Gabriel, 1992), die Chitinsynthese (Roncero und Duran, 1985, Garcia-Rodriguez *et al.*, 2000) und eine Akkumulation sekretorischer Vesikel gezeigt (Vannini *et al.*, 1987). Ferner ist Kongorot in Säugerzellen in der Lage Prionen-formende Proteine zu binden und dadurch möglicherweise die Ausbildung amyloider Partikel zu verhindern (Caspi *et al.*, 1998). Mit Ure2p existiert ein solches Protein auch in *S. cerevisiae* (Wickner, 1994). Der Verlust dieses Proteins ( $\Delta$ ure2) ist interessanterweise in TOR-abhängiger Weise rapamycinsensitiv (Chan *et al.*, 2000). Tor2p aktiviert jedoch über Rom2p und Rho1p den Pkc1p-Signaltransduktionsweg (Schmidt *et al.*, 1997). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Wirkung von Kongorot über diese Verbindung zwischen Ure2p und dem Pkc1p-Weg entfaltet. Da sowohl Mutanten in C1A als auch Mutanten in C1B Kongorotsensitivität vermitteln, werden offenbar beide für eine Aktivierung unter diesen Bedingungen benötigt. Anders ist die Lage bei Wachstum auf „Calcofluor white“. Die in der Literatur beschriebene Wirkung dieses Farbstoffes stimmt in weiten Teilen mit der von Kongorot überein (Roncero und Duran, 1985). In erster Linie ist auch hier wieder die Integrität der Zellwand betroffen, während bei Kongorot jedoch die negativen Effekte auf die Synthese von  $\beta$  (1,3)-Glukan überwiegen, ist bei „Calcofluor white“ vornehmlich die Synthese von Chitin betroffen. Solchermaßen induzierter Zellwandstreß führt zu einer Hyperaktivierung von Rho1p (Delley und Hall, 1999), was auch eine Bindung an Pkc1p mit nachfolgender Aktivierung derselben nach sich zieht. Zur Deutung der erhaltenen Phänotypen ergeben sich dadurch zwei Möglichkeiten:

Zum einen besteht die Möglichkeit, daß eine sensitive Pkc1p-Mutante nicht mehr in der Lage ist, Rho1p zu binden und durch die geringere Aktivität im Pkc1p-Weg die notwendigen Gene der Zellwandbiosynthesegene nicht in einem Maße transkribiert werden, das ausreichen würde, die durch „Calcofluor white“ induzierten Schäden zu reparieren. Damit würde Rho1p an C1A binden. Zum anderen scheint jedoch die Wirkung von „Calcofluor white“ auf die Synthese einiger Komponenten der Zellwand, wie Chitin und  $\beta$  (1,3)-Glukan beschränkt zu sein. Aus diesem Grund ist auch noch ein anderes Szenario vorstellbar (Abb. 4.1): Da Rho1p

neben seiner Rolle als Aktivator von Pkc1p auch noch die regulatorische Untereinheit des Glukansynthasekomplexes ist (Drzonova *et al.*, 1996), ist möglicherweise eine Erhöhung der Aktivität dieses Komplexes ausreichend, um Wachstum auf „Calcofluor white“-haltigem Medium zu vermitteln. Bindet nun eine Pkc1p Mutante Rho1p schlechter, so steht mehr Rho1p zur Verfügung, das mit dem Glukansynthasekomplex interagieren kann und die Aktivität dieses Komplexes wird erhöht. In diesem Fall würde das Wachstum der Mutanten eine Interaktion mit C1B bedeuten. Welche der beiden Möglichkeiten hier zutrifft kann alleine durch die Analyse der Phänotypen also nicht geklärt werden.



**Abbildung 4.1: Mögliche Auswirkungen von C1 Mutationen auf die Sensitivität der Zellen**

In Teil a) der Abbildung ist die Situation im Wildtyp dargestellt. Aktiviertes Rho1p bindet sowohl an Pkc1p als auch an den Glukansynthasekomplex. In Zellen mit Pkc1p deren C1 mutiert ist (b), ist die Wechselwirkung mit Rho1p herabgesetzt. Es steht mehr Rho1p-GTP für die Bindung und Aktivierung des Glukansynthasekomplexes zur Verfügung. Somit rufen Stoffe, deren Wirkung eine hohe Aktivität des Pkc1p-Weges erfordert eine Sensitivität der Zellen hervor. Gegen Stoffe, die auf das Glukan in der Zellwand oder auf die Glukansynthese wirken, kann jedoch auch eine Resistenz entstehen.

Auch das Wachstum der Mutanten auf koffeinhaltigem Medium kann hier keinen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung leisten, da die Ursache der Wirkung von Koffein auf Hefezellen nach wie vor unklar ist. Von den bekannten Wirkungen des Koffeins kann im Zusammenhang mit Mutanten des Pkc1p-Weges zumindest die Hemmung der Phosphodiesterase des cAMP/RAS-Weges ausgeschlossen werden. Martin *et al.* (2000) konnten nämlich zeigen, daß die Phosphorylierung der MAP Kinase Mpk1p in Deletionen der, für die Phosphodiesterase kodierenden Gene ( $\Delta pde1/\Delta pde2$ ) nicht verändert ist. Die Autoren beobachteten zusätzlich, daß die Koffeinsensitivität von Mpk1p-Mutanten durch das „Multi Drug Protein“ Snq2p aufgehoben werden kann. Da dieses Protein wahrscheinlich das Koffein aus der Zelle transportiert, schlossen die Autoren, daß die Wirkung des Koffeins auf zellinternen Effekten beruht und das Koffein nicht auf die Zellwand selbst wirkt. Für diesen zellinternen Effekt kann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit eine Deregulation des zellinternen Calciumspiegels ausgeschlossen werden (Steenbergen und Fay, 1996), da Pkc1p zumindest *in vitro* nicht durch Calciumionen aktiviert wird (Antonsson *et al.*, 1994). Denkbar für eine zellinterne Wirkung des Koffeins wäre auch eine inhibitorische Wirkung auf ein anderes Ziel-Protein. Eine solche Wirkung wurde von Moser *et al.* (2000) für das Rad3p Protein in *Schizosaccharomyces pombe* beschrieben. Interessanterweise findet man bei einer BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1990) mit *S. pombe* Rad3p über alle *S. cerevisiae*-Proteine Tor2p mit dem zweithöchsten Ergebnis und einer Identität von 23%. Tor2p aktiviert den Pkc1p-Weg über Rho1p (Schmidt *et al.*, 1997). Möglicherweise setzt also Koffein die Menge an aktiviertem Rho1p über diesen Weg herab. Dadurch wäre zum einen die Glukansynthese betroffen, was eine geschwächte Zellwand zur Folge hätte. Zum anderen wäre dann aber auch die durch diese Schäden ausgelöste Signalweiterleitung über den Pkc1p Weg nicht in vollem Umfang möglich. Geht nun durch Mutation einer C1-Sequenz die Fähigkeit zur Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p völlig verloren, würden die Zellwandschäden Überhand nehmen und die Zellen sterben. In diesem Fall würde die Sensitivität der Deletion von C1B bedeuten, daß dies der Ort der Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p ist. Zusätzlich zu den, in dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungen der Phänotypen, wurden von Jöckel (1999) mit denselben Mutanten-Allelen „Dihybrid“ Untersuchungen durchgeführt. Diese Versuche ergaben, daß sowohl die Deletion, als auch die strukturzerstörende Mutation (C<sub>434,437</sub>S oder C<sub>514,517</sub>S) eines der beiden C1-Motive zum Verlust der Interaktion zwischen einem entsprechenden Pkc1p-Fragment und einem aktivierten Rho1p führte.

Diese Beobachtung scheint im Widerspruch mit den hier vorgelegten phänotypischen Analysen zu stehen, nach die obigen Mutationen unterschiedliche Phänotypen zeigten. Dies kann jedoch möglicherweise dadurch erklärt werden, daß für die „Dihybrid“-Versuche der

aminoternale Bereich von Pkc1p deletiert wurde. Dieser trägt jedoch, wie die in dieser Arbeit in Abschnitt 3.2 durchgeführten Experimente zeigen, zu der Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p bei.

### **4.1.3 Aminosäurereste in C1B sind verantwortlich für den Kontakt zwischen Rho1p und der C1-Domäne**

Da die oben geschilderten Phänotypen auf eine Interaktion von Rho1p nur mit C1A oder C1B hinweisen, wurden von Jöckel (1999) jeweils in diesen beiden Regionen Mutationen erzeugt, für die aus Untersuchungen der homologen C1 aus Raf-Kinase eine Rolle für die Interaktion mit Ras bekannt war. Diese Mutanten wurden dann auf ihre Fähigkeit zur Wechselwirkung mit Rho1p und ihre Aktivierbarkeit durch Rho1p in einem *in vitro*-Kinasetest untersucht. Dabei zeigten lediglich Mutationen von Resten in C1B eine Beeinträchtigung beider Fähigkeiten (Jöckel, 1999). Die Untersuchung der *in vivo*-Funktion dieser Mutanten im Rahmen der vorliegenden Arbeit (Abb. 3.7) ergab für alle drei Mutanten einen Wachstumsdefekt auf zumindest einem der Selektivmedien mit „Calcofluor white“, Koffein und Kongorot. Alle drei isolierten Mutanten E<sub>514</sub>A, D<sub>529</sub>A und R<sub>483</sub>A sind nicht mehr fähig, auf kongorothaltigem Medium zu wachsen. Besonders auffällig ist das Wachstumsverhalten der D<sub>529</sub>A-Mutanten auf Koffein. Anders als die beiden anderen verleiht diese Mutation auf Koffein eine Resistenz, so daß die Zellen noch bei Konzentrationen des Wirkstoffes wachsen, bei denen schon das Wachstum des Wildtyps gehemmt wird. Über die Ursachen hierfür kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Eventuell ermöglicht die Mutation, die eine Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p an der C1B inhibiert, eine einfachere Aktivierung des Enzymes über die aminoternale HR1-Domäne. Es wäre auch denkbar, daß die Mutation zwar auf die Interaktion mit Rho1p wirkt, dabei jedoch eine Konformationsänderung herbeiführt, welche die Schwelle für eine Aktivierung des Enzymes an C1A über einen alternativen Aktivator herabsetzt. Auf „Calcofluor white“-haltigem Medium zeigt nur die Mutante R<sub>483</sub>A einen Wachstumsdefekt. Somit scheint vor allem bei dieser Mutanten die Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p vollständig unterbunden zu sein. In Kombination der oben geschilderten phänotypischen Analysen mit den Ergebnissen der „Dihybrid“-Untersuchungen und der Kinasetests aus Jöckel (1999) zeichnet sich ab, daß der Teil der C1-Domäne, der mit Rho1p in Kontakt steht, wahrscheinlich C1B ist. Insbesondere die Wachstumsphänotypen deuten jedoch darauf hin, daß die übrige Domäne möglicherweise durch Stabilisierung der Tertiärstruktur das Zustandekommen dieser Wechselwirkung unterstützt. Ein ähnlicher Effekt wurde auch schon für die HR1C-Wiederholung von PRK1 postuliert (Flynn *et al.*, 1998). Zudem konnte kürzlich von Hoyos *et al.* (2000) auch eine Funktion für C1A bei Pkc1p von Hefe



gezeigt werden. Die Autoren wiesen an dieser Stelle eine Bindung von Retinoiden nach. Als Funktion dieser Bindung postulierten sie eine Rolle bei der Aktivierung von Proteinkinase C-Enzymen unter oxidativem Streß. Das eine Bindung von Retinoiden für C1B bei diesen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte, bestätigt indirekt die hier erhaltenen Ergebnisse, nach denen den beiden Subdomänen unterschiedliche Funktionen zukommen (siehe auch Abbildung 4.3).

#### **4.1.4 Austauschmutanten der C1 Domäne geben keine Hinweise auf eine Aktivierbarkeit von Pkc1p durch DAG**

Nach wie vor blieb jedoch auch durch die obigen Ergebnisse die Frage einer möglichen Aktivierbarkeit der Proteinkinase C in Hefe durch DAG ungeklärt. Aus diesem Grund wurden in dem in Abschnitt 3.1.2.3 geschilderten Ansatz die kompletten C1-Domänen der Raf-Kinase und von PKC  $\eta$  anstelle der homologen Bereiche von Pkc1p aus *S. cerevisiae* inseriert. Diese Strategie basiert auf der Einteilung von C1-Domänen in DAG-bindende und nicht-DAG-bindende, die von Hurley *et al.* (1997) auf Grund von Homologievergleichen vorgenommen wurde. Im Wesentlichen verglichen die Autoren C1-Domänen, über deren Fähigkeit zur DAG-Bindung bekannt war, mit solchen, die bekanntermaßen kein DAG binden können. Dann legten die Autoren Reste fest, die für eine DAG Bindung unbedingt notwendig d.h. konserviert sind. Mit Hilfe dieser Konsensussequenz wurden dann C1 Domänen, über deren Fähigkeit zur DAG-Bindung keine Erkenntnisse vorlagen, in eine der Klassen eingeteilt. Diese Einteilung ergab für die C1-Domäne der Proteinkinase C aus Hefe eine Zugehörigkeit zur Klasse der nicht zur DAG-Bindung fähigen Domänen. Raf-Kinase C1 wird dabei in dieselbe Klasse eingeordnet wie die von Hefe Pkc1p. Die C1 von PKC  $\eta$  gehört jedoch zur Klasse der DAG-bindenden Domänen. Sollte die Insertion einer der Domänen die C1-Domäne von Pkc1p funktionell ersetzen können, so würde dies eine ähnliche Funktion beider Domänen nahelegen. Gleichzeitig wird durch diesen Versuch die von Hurley *et al.* (1997) aufgestellte Hypothese erstmals in der Praxis überprüft. Die Analyse der Phänotypen von Hefe mit chimären C1-Domänen in Pkc1p ergab, daß C1 der Raf-Kinase auf einigen Selektivmedien die Funktion der C1 von *S. cerevisiae* Pkc1p übernehmen kann (Abbildung 3.9). Sogar in dem Fall, bei dem lediglich Raf Kinase C1 und weder C1A noch C1B aus Hefe im Protein vorhanden war konnte dies beobachtet werden. Dabei muß bedacht werden, daß in der Raf-Kinase C1 im Gegensatz zur Hefe Pkc1p nur aus einer Wiederholung des Motives besteht. Das eine Komplementation z.B. auf Medium mit 15 mM Koffein nicht möglich ist, liegt möglicherweise daran, daß der natürliche Interaktionspartner der Raf-Kinase-C1 das Säuger-Ras und nicht Hefe-Rho1p ist. Beim Austausch der Hefe C1 gegen PKC  $\eta$  C1 sind die

Zellen auf keinem der Medien mit Koffein, „Calcofluor white“ oder Kongorot mehr in der Lage zu wachsen. Dies deutet, wie alle bisherigen Ergebnisse auch, darauf hin, daß DAG Pkc1p nicht aktiviert. Die Phänotypen implizieren zudem eine Wechselwirkung zwischen Rho1p und Pkc1p mit einer Insertion der Raf-Kinase-C1, nicht aber zwischen Rho1p und Pkc1p mit Insertion der C1 aus PKC  $\eta$ . Dies konnte überraschenderweise nicht durch die in Abschnitt 3.1.3.3.2 durchgeführten „Dihybrid“-Untersuchungen verifiziert werden. Beide C1-Austauschmutanten schienen zunächst wie der Wildtyp in der Lage zu sein mit Rho1p zu interagieren. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch noch nicht bekannt, daß Pkc1p, wie in Abschnitt 3.2 in Abb. 3.17 gezeigt, im aminoterminalen Bereich eine zweite Interaktionsstelle mit Rho1p besitzt. Tatsächlich ergab dann die Wiederholung der Interaktionstests mit aminoterminal verkürzten Allelen von Pkc1p ein Ergebnis, das sich mit den erhaltenen Phänotypen in Einklang bringen läßt. Ein Pkc1p Fragment mit der *S. cerevisiae* C1-Domäne interagiert mit einem daueraktiven Rho1p. Tauscht man die C1-Domäne gegen die der Raf-Kinase, ist mit Hilfe des *HIS3*-Reportergenes keine Interaktion mehr nachweisbar. Eine Aktivität des zweiten Reportergenes der  $\beta$ -Galaktosidase ist aber nach wie vor vorhanden. Diese, wenn auch schwache Wechselwirkung ist ausreichend, um der Mutanten eine Resistenz gegenüber Koffeinkonzentrationen zu vermitteln, die fast an die des Wildtypes heranreicht. Auch hier kann die schwächere Wechselwirkung darauf zurückgeführt werden, daß das chimäre Pkc1p mit dem heterologen Hefe-Rho1p interagieren muß und nicht dem natürlichen Säuger-Ras. In diesem Zusammenhang wäre es interessant die hier durchgeführten „Dihybrid“ Versuche mit Ras an Stelle von Rho1p durchzuführen. Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 3.10 bei Einsatz von PKC  $\eta$  in Hefe Pkc1p, so erkennt man, daß weder mit dem *HIS3*- noch mit dem  $\beta$ -Galaktosidase-Reporter eine Interaktion nachweisbar ist. Dies stimmt ebenfalls mit den Phänotypen dieser Mutanten überein, die sowohl gegen Kongorot, „Calcofluor white“, als auch Koffein im Medium sensitiv sind.

Überraschend war in Zusammenhang mit der Untersuchung dieser Mutanten auch das Ergebnis der Bestimmung der Mpk1p-Phosphorylierung als Maß für die Aktivität des Signaltransduktionsweges. Der Wildtyp zeigte das zu erwartende Bild: Eine Zunahme der dualen Phosphorylierung von Mpk1p bei Aktivierung des Weges durch Koffein im Medium. Auffällig war jedoch die Zunahme auch der Gesamtmenge an Mpk1p bei Zugabe von Koffein. Dies wurde in anderen Arbeiten zur Phosphorylierung von Mpk1p bisher nicht beobachtet (Verna *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2000; de Nobel *et al.*, 2000). Bei der Durchführung der Versuche im Vergleich zu den Experimenten dieser Arbeit besteht allerdings ein entscheidender Unterschied. In den erwähnten Publikationen wurde immer das *MPK1*-Gen überexprimiert und zumeist noch mit der kodierenden Sequenz eines zusätzlichen

Epitopes fusioniert, um einen einfacheren Nachweis zu gewährleisten. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen war in den Zellen jedoch nur das genomische Allel von Mpk1p zugegen. Es liegt also nahe, daß die Situation in Wildtyp-Zellen eher den in Abb. 3.11 gemachten Beobachtungen entspricht. Dafür sprechen auch Transkriptionsprofile von Zellen in denen daueraktive Allele von Pkc1p exprimiert wurden und bei denen ein Anstieg in der Expression von *MPK1* zu beobachten ist (Roberts *et al.*, 2000). Die intrazelluläre Konzentration von Mpk1p wird also offenbar über eine Rückkopplung durch die Aktivität des eigenen Weges reguliert. Neben diesen Beobachtungen, zeigte sich zudem bei Zellen mit C1-chimären von Pkc1p eine Erhöhung sowohl der phosphorylierten- als auch der Gesamtmenge an Mpk1p im Vergleich zum Wildtyp. Dies gilt sowohl wenn die Zellen unter nicht induzierenden, als auch wenn die Zellen unter induzierenden Bedingungen angezogen wurden und konnte bei beiden Austauschmutanten beobachtet werden. Das normalisierte Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Protein zeigt jedoch bei beiden Mutanten einen Rückgang, von nicht induzierenden zu induzierenden Anzuchtbedingungen. In jedem Fall ist in den Mutanten eine Deregulation der *MPK1*-Expression und Phosphorylierung zu beobachten. Eine ähnliche, deregulierte Phosphorylierung wurde auch schon von Lorberg, 2001 bei der Untersuchung einer *rom2*-Deletion beobachtet. Genau wie in dem hier vorliegenden Fall widersprach dort der Phosphorylierungszustand von Mpk1p den beobachteten Phänotypen der Mutanten. Wie dies zustande kommt, kann mit den vorliegenden Daten nicht erklärt werden. Allerdings legen die Ergebnisse nahe, daß die Regulation des Pkc1p-Weges wesentlich komplexer ist, als bisher angenommen und daß verschiedene Rückkopplungsmechanismen auf verschiedenen Ebenen des Weges greifen.

## 4.2 Die regulatorische Funktion des aminoterminalen Bereiches von Pck1p

Erste Hinweise auf eine regulatorische Funktion des aminoterminalen Bereiches von Pkc1p finden sich bei Mellor und Parker, 1998. Die Autoren wiesen als erste eine Funktion der sogenannten HR1-Domäne in der humanen PRK1 nach (Flynn *et al.*, 1998) und in der Folge darauf hin, daß homologe Sequenzen auch in Pkc1p von *S. cerevisiae* existieren. Zu diesem Zeitpunkt lagen im Rahmen der hier geschilderten Untersuchungen schon die Phänotypen der aminoterminalen Deletion von Pkc1p vor. Diese Untersuchungen waren der erste experimentelle Hinweis auf eine Funktion des aminoterminalen Bereiches von Pkc1p. Diesen Hinweisen wurden durch die Isolierung von Punktmutanten durch einen genetischen Ansatz neue hinzugefügt. Wie die Rekonstruktion einzelner dieser Mutationen zeigte, sind die

beobachteten Phänotypen der Koffein-, „Calcofluor white“- und Kongorotsensitivität auf den Austausch eines hochkonservierten Leucinrestes an Position 54 gegen Serin zurückzuführen. Somit scheint klar, daß die HR1-Domäne in *S. cerevisiae* eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Pkc1p spielt.

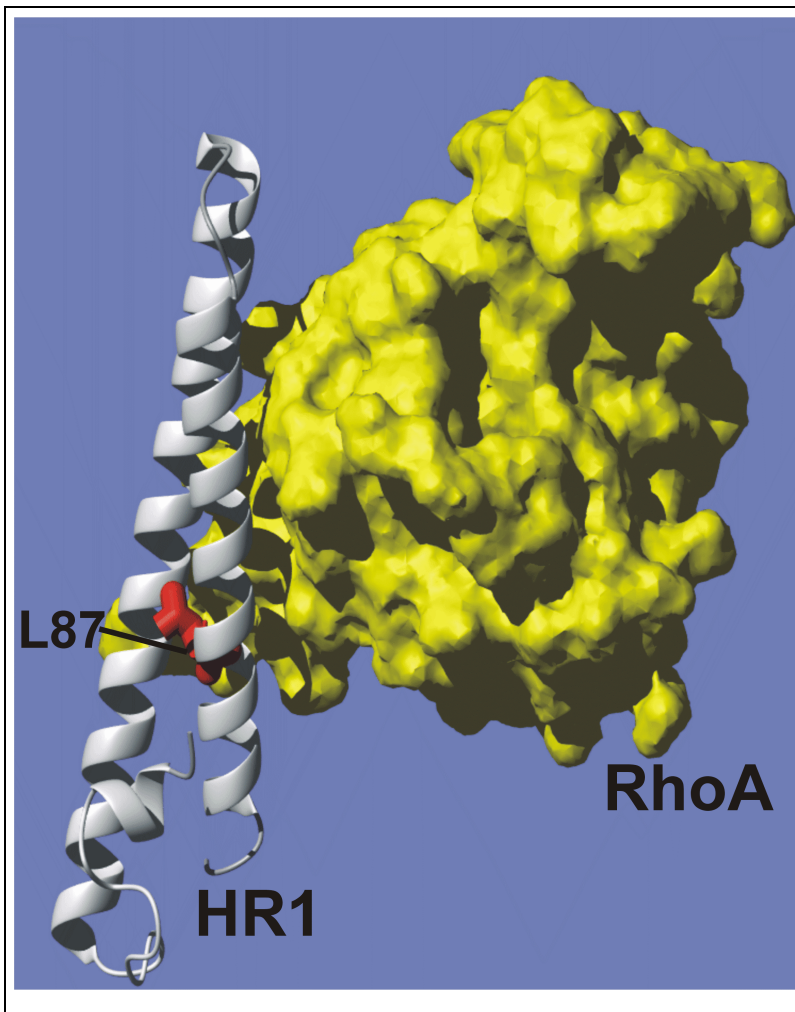
#### **4.2.1 Die beobachteten Phänotypen der HR1-Mutanten sind möglicherweise unabhängig vom MAP-Kinase-Modul**

Zum Nachweis, daß wirklich die Aktivierung von Pkc1p betroffen ist, wurde erneut die Phosphorylierung von Mpk1p bestimmt. Diese zeigte jedoch sowohl für den Wildtyp, als auch für die Mutante Pkc1p-L<sub>54</sub>S eine gleichmäßige Zunahme der Phosphorylierung bei Aktivierung des Pkc1p-Weges. Ähnliches wurde auch bei Messungen mit dem in Abschnitt 3.4 beschriebenen Reportersystem beobachtet, die im Ergebnisteil jedoch nicht wiedergegeben sind, da sie aus Zeitgründen nur einmal durchgeführt wurden. Für dieses Verhalten können zwei Erklärungsmöglichkeiten gegeben werden: Zum Einen sind eventuell die Effekte der Mutation auf die Aktivierung trotz der Phänotypen so gering, daß sie durch die verwendeten Nachweismethoden nicht erfaßt werden. Zum Anderen besteht die Möglichkeit, daß eine Aktivierung an der HR1-Domäne nur bei einer der MAP-Kinase-unabhängigen Funktion von Pkc1p, wie sie in Abschnitt 1.2.2 geschildert wird, erfolgt.

#### **4.2.2 Die HR1-Domäne von Pkc1p interagiert mit Rho1p**

Ungeklärt war nach wie vor die Frage, wie eine Aktivierung von Pkc1p an der HR1 Domäne erfolgt. Für Proteine wie PRK1, die ebenfalls HR1-Domänen enthalten, sind diese für die Interaktion mit RhoA bzw. RhoB verantwortlich (Flynn *et al.*, 1998, Mellor *et al.*, 1998). Da Pkc1p wie oben bereits gezeigt, mit Rho1p interagiert, lag zunächst nahe, hier die Stelle für die Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p zu vermuten. Dem standen aber die Ergebnisse von Nonaka *et al.* (1995) entgegen, die für den aminoterminalen Bereich von Pkc1p keine Wechselwirkung mit einem daueraktiven Rho1p nachweisen konnten. Wie Abbildung 3.17 zeigt, konnte diese Beobachtung in dieser Arbeit auch für ein Fragment, welches nur die HR1-Domänen enthält, bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde auch zunächst versucht, mit einem HR1-Fragment aus Pkc1p eine Interaktion mit einem der zur Familie der Rho-GTPasen aus *S. cerevisiae* gehörenden Proteine nachzuweisen. Dabei wurden sowohl daueraktive Mutanten als auch Wildtyp-Proteine verwendet. Diese Bemühungen blieben jedoch erfolglos. Erst ein Kontrollversuch mit den in Abschnitt 4.1.4 diskutierten Experimenten ergab hier neue Erkenntnisse:

Ein „Vollängen-Pkc1p-Protein“ mit deletierter C1-Domäne ist nach wie vor in der Lage mit Rho1p zu interagieren. Um zu untersuchen, ob diese Interaktion mit der HR1-Domäne erfolgt, wurde auch ein Pkc1p-Protein mit einer C1-Deletion zusammen mit der Mutation L<sub>54</sub>S auf seine Fähigkeit zur Interaktion mit einem daueraktiven Rho1p getestet. Da hier keine Wechselwirkung mehr nachzuweisen war, ist offensichtlich, daß der Leucinrest an Position 54 für die Bindung von Rho1p an Pkc1p wichtig ist. Das eine Bindung an ein Fragment, welches nur die HR1 Domäne umfaßt, nicht erfolgt, legt zudem nahe, daß weitere Reste von Pkc1p entweder an dieser Interaktion partizipieren oder zumindest die Struktur der HR1-Domäne stabilisieren. Abbildung 4.2 zeigt ein Modell, das auf der Struktur von HR1 aus PRK1 im Komplex mit RhoA beruht (Maesaki *et al.*, 1999). Dabei ist die antiparallele „coiled coil“-Struktur der HR1-Domäne als Bändermodell und RhoA als Oberflächenmodell wiedergegeben. Die Seitenkette des zum Leucin 54 der Hefe Pkc1p korrespondierenden Leucinrestes 87 der PRK1 HR1 Domäne ist rot markiert. Wie man erkennt, liegt dieser Rest zwischen den beiden  $\alpha$ -Helices und interagiert nicht direkt mit RhoA. Hydrophobe Reste, wie Leucin, lagern sich häufig im Innern von Strukturen aneinander an und sind somit an der Aufrechterhaltung der Struktur beteiligt. Dies scheint auch hier der Fall zu sein. Die Umwandlung dieses Restes in das durch seine Hydroxylgruppe sehr viel hydrophilere Serin führt mit großer Wahrscheinlichkeit zur Destabilisierung der HR1-Struktur. Möglicherweise lagern sich die beiden  $\alpha$ -Helices nicht mehr aneinander an und bilden nicht mehr den HR1 typischen Finger aus. Somit wäre die Wirkung der isolierten L<sub>54</sub>S Mutation vergleichbar mit der in Abschnitt 3.1 geschilderten Mutation der zinkbindenden Reste in der C1-Domäne. Neben der, in Abbildung 4.2 gezeigten Kontaktstelle zwischen HR1 und RhoA existiert eine zweite auf der dem Betrachter zugewandten Seite der Struktur (Maesaki *et al.*, 1999). Sollte auch die HR1-Domäne von *S. cerevisiae* Pkc1p in der Lage sein an zwei verschiedenen Stellen eine kleine GTPase zu binden, würde dies erklären, warum bei der isolierten Mutanten ein Rest verändert ist, der an der Aufrechterhaltung der Struktur beteiligt ist und kein Rest, der direkt mit dem Rho-Protein in Kontakt steht. Alle vorliegenden Daten über Struktur und Funktion von HR1-Domänen, zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit, deuten also darauf hin, daß in der Pkc1p-L<sub>54</sub>S-Mutanten die Struktur der HR1 Domäne gestört wird und somit die Fähigkeit zur Interaktion mit Rho1p verloren geht.



**Abbildung 4.2: 3D-Struktur einer HR1-Domäne im Komplex mit RhoA**

Gezeigt ist die Struktur der HR1 Domäne aus PRK1 im Komplex mit RhoA. die Abbildung beruht auf einer Röntgenstrukturanalyse von Maesaki *et al.* (1999). Die HR1-Domäne ist als Bändermodell, RhoA als Oberflächenmodell dargestellt. Der auf Grund von Homologievergleichen, entsprechende Rest zu Leucin 54 der Hefe-Pkc1p ist rot dargestellt. Das Modell wurde mit Hilfe des Programmes MolMol Version 2k.1 erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

### 4.3 Die Kombination von Mutationen in C1 und HR1 ist letal

Die in den vorhergehenden Abschnitten diskutierten Ergebnisse deuten alle darauf hin, daß sowohl HR1- als auch C1-Domänen für die Bindung von Rho1p an Pkc1p und damit für die Aktivierung des Enzyms wichtig sind. In den jeweiligen Einzelmutanten ist, wie durch die „Dihybrid“-Versuche gezeigt, immer noch eine Interaktion zwischen Rho1p und Pkc1p vorhanden. Dies erklärt auch, warum die beobachteten Phänotypen im Vergleich zur Deletion, die in dem verwendeten Stammhintergrund letal ist, deutlich abgeschwächt sind. So war z.B. keine der betrachteten Mutanten temperatursensitiv. Die Kombination von Mutationen in C1 und HR1 sollte jedoch eine Interaktion vollständig unterbinden. Erwartungsgemäß sind Zellen, die solchermaßen mutierte Allele von *pkc1* tragen nicht mehr lebensfähig und können auch nicht durch die Zugabe osmotischer Stabilisatoren gerettet werden (vgl. Abschnitt 3.3)

## 4.4 Modell der Aktivierung von Pkc1p

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse führten, zusammen mit Modellen, die für die Proteinkinase C-„Superfamilie“ aufgestellt wurden (Parekh *et al.*, 2000), zu einer Hypothese für den Ablauf der Aktivierung der Pkc1p in Hefe (Abbildung 4.3). Danach ist das translatierte Protein zunächst inaktiv. Dies folgt unter anderem aus den Untersuchungen von Inagaki *et al.*, 1999, die zeigen konnten, daß eine Phosphorylierung von Pkc1p durch Pkh2p erfolgen muß, damit Enzymaktivität nachgewiesen werden kann. Pkh2p ist jedoch eine lipidabhängige Kinase und kann damit nur direkt an Membranen seine Aktivität entfalten. Aus diesem Grund muß Pkc1p als Substrat von Pkh2p zunächst an die Membran dirigiert werden. Dies kann, wie in Abbildung 4.3 2) gezeigt, durch die Bindung von Rho1p an die C1-Domäne vermittelt werden. Es ist jedoch auch vorstellbar, daß diese Interaktion sowohl mit der C1- als auch mit der HR1-Domäne erfolgt. Dies kann aus den erhaltenen Ergebnissen nicht geschlossen werden. Allerdings deutet die Tatsache, daß in C1-Pkc1p-Mutanten ein Rückgang der Aktivität des MAP-Kinase-Weges zu beobachten ist, in HR1-Pkc1p-Mutanten jedoch nicht, darauf hin, daß die Aktivierung an den beiden Domänen unabhängig voneinander erfolgt. Die in Abbildung 4.3 dargestellte Reihenfolge (zuerst Aktivierung an C1, dann an HR1) ist willkürlich gewählt und könnte ebenso umgekehrt sein. Auch die in Abbildung 4.3 4) gezeigte Autophosphorylierung ist für Pkc1p noch nicht nachgewiesen. Die entsprechenden Reste an denen homologe Säugerenzyme autophosphoryliert werden, sind jedoch auch in Hefe-Pkc1p konserviert. In Analogie zu Modellen für andere Mitglieder der PKC „Superfamilie“ kann postuliert werden, daß sich das phosphorylierte Enzym von seinem Aktivator löst.

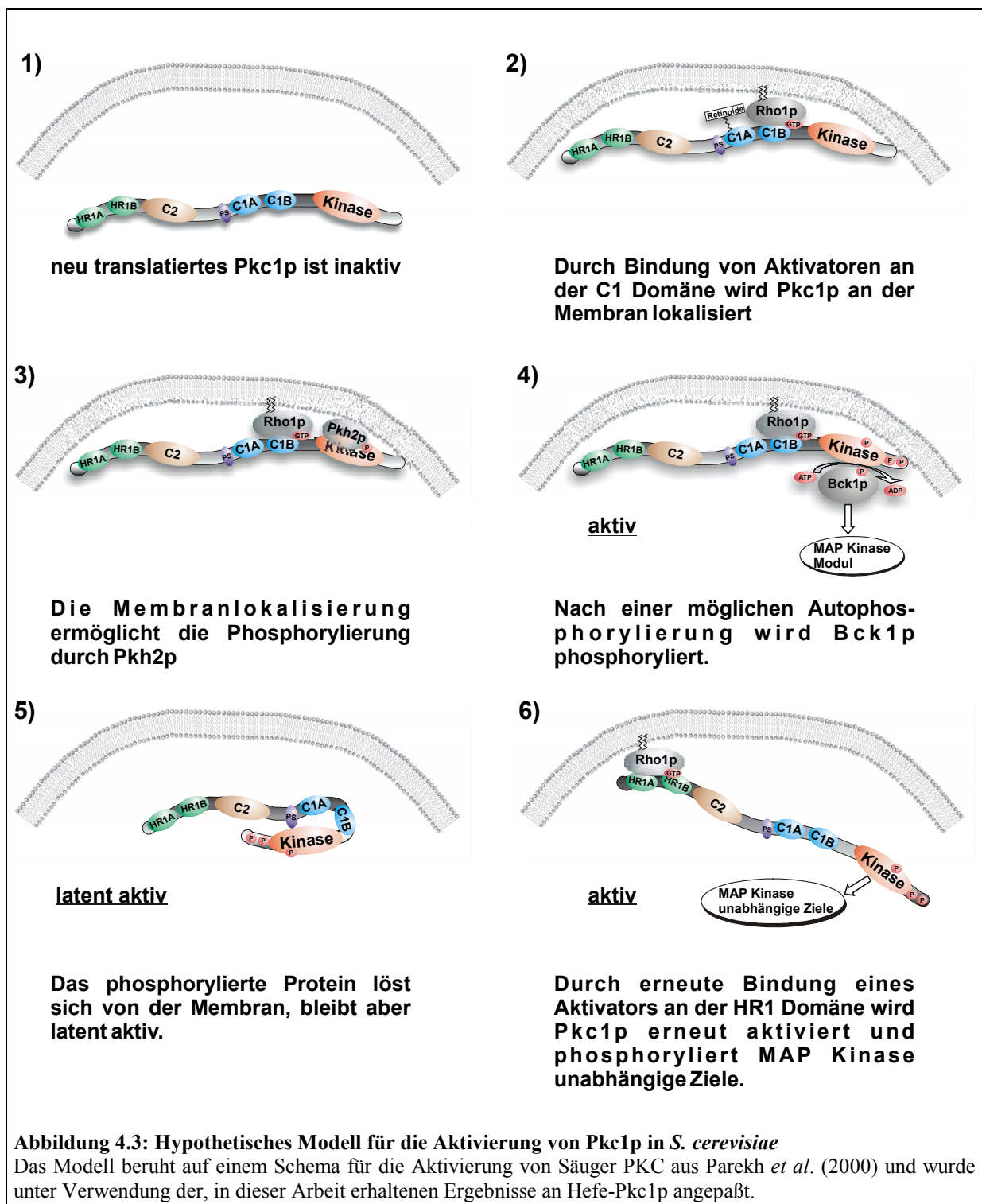


Abbildung 4.3: Hypothetisches Modell für die Aktivierung von Pkc1p in *S. cerevisiae*

Das Modell beruht auf einem Schema für die Aktivierung von Säuger PKC aus Parekh *et al.* (2000) und wurde unter Verwendung der, in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse an Hefe-Pkc1p angepaßt.

Für dieses in Abbildung 4.3 5) gezeigte, latent aktive Protein existieren nun zwei Möglichkeiten. Zum einen die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung durch eine Phosphatase. Zum anderen die erneute Bindung eines Aktivators (hier für die HR1-Domäne gezeigt). Diese Hypothese eines Zyklus der Proteinkinase C in Hefe würde auch die Beobachtung von Andrews und Stark (2000) erklären, die einen zyklischen Verlust der Rho1p-abhängigen Lokalisierung von Pkc1p ca. alle 10 Minuten beobachteten. Das Ablösen einer latent aktiven Pkc1p von der Plasmamembran würde dem Protein auch erst die



Interaktion mit anderen Proteinen, wie den Komponenten der Oligosaccharyltransferase (Park und Lennarz, 2000) ermöglichen. Somit ermöglicht erst das Vorhandensein sowohl einer C1- als auch einer HR1-Domäne der Proteinkinase C die Regulation einer Vielzahl von Vorgängen in der Zelle. Da alle bisher beschriebenen, zur Familie der Pilze gehörenden Proteinkinase C-Homologen denselben Aufbau besitzen, kann man hier auch von einer prototypischen Gruppe der „fungalen PKC-Enzyme“ sprechen. Mit zunehmender Komplexität der zellulären Vorgänge in höheren Organismen konnte ein Enzym allein nicht mehr alle hinzukommenden Aufgaben bewältigen, so daß eine Gruppe von Isoenzymen entstand. So besitzt *S. pombe*, eine Hefe, deren Physiologie und Zellzyklus im allgemeinen als näher mit Säugerzellen verwandt angesehen wird, als die von *S. cerevisiae*, schon zwei PKC-Homologe, die aber immer noch den für Pilze typischen Aufbau zeigen. Mit dem Schritt zur Mehrzelligkeit steigt dann die Menge der PKC-Homologen sprunghaft an (siehe Tabelle 1.1). Aus diesem Grund sind die hier gewonnenen Erkenntnisse besonders dahingehend wertvoll, daß sie zeigen welche Funktionen und Regulationsmechanismen ursprünglich sind und welche erst bei zunehmender Komplexität des Organismus hinzukamen und deshalb insbesondere mit spezifischen multizellulären Funktionen, wie z.B. der interzellulären Kommunikation verknüpft sein könnten.

## 4.5 Identifikation weiterer an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität beteiligter Gene

Durch einen genetischen Ansatz sollte versucht werden neue Gene zu identifizieren, die an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität beteiligt sind und eventuell negative Regulatoren des Pkc1p-Weges darstellen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Ansätzen, bei denen Zellen isoliert werden, die phänotypische Auffälligkeiten oder Wachstumsdefekte zeigen, wurde bei dem hier durchgeführten Ansatz ein Reportersystem eingesetzt. Dieses Reportersystem, das auf einer Idee von Watanabe *et al.* (1995) beruht und in ähnlicher Form von Dodou und Treisman (1997) eingesetzt wurde, wurde für diese Arbeit erstmals auf einem Plasmid zusammengefaßt. Das erhaltene Konstrukt ermöglicht einen einfachen Test der Aktivität des Pkc1p-Weges und wurde in der Arbeit von Kirchrath *et al.*, 2000 bereits auf seine Funktionalität getestet. Somit war es bei dem hier entwickelten Ansatz möglich, auch Gene zu identifizieren, deren Deletion sich nicht in einem Wachstumsdefekt äußert. Da Klone isoliert wurden, die bei zufälliger Insertion eines Transposons in ihr Genom eine erhöhte Aktivität des Pkc1p-Weges aufwiesen, wurden zwei Klassen von Mutanten erwartet: Die Gene der ersten Klasse besitzen eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und die Insertion des Transposons führt zu einem Schaden, zu dessen Kompensation die Aktivität des Pkc1p-Weges erhöht wird. Die Gene der zweiten Klasse besitzen eine direktere Funktion bei der Regulation des Pkc1p-Weges. Durch die Insertion des Transposons wird ihre negative regulatorische Funktion aufgehoben. In Tabelle 3e.1 sind die bei dem Ansatz isolierten Mutanten zusammengefaßt. Bestimmte Gene diesen Klassen zuzuordnen, ist ohne Kenntnis über die Funktion der zugehörigen Proteine nicht möglich. Ein Blick auf die bekannten Funktionen einiger Genprodukte erlaubt jedoch schon eine grobe Einteilung.

### 4.5.1 Gene mit mitochondrialer Funktion

*YHM2*, *YOR356W* und *YFR045W* kodieren mit großer Wahrscheinlichkeit für mitochondriale Proteine (El Moualij *et al.*, 1997). Zwei von ihnen sind wahrscheinlich mitochondriale Transporter und die von ihnen transportierten Stoffe dienen offenbar auch der Regulation des osmotischen Zustands der Zelle. Eine Elektronen-Transfer-Flavoprotein-Ubichinon-Oxidoreduktase, für die möglicherweise *YOR356W* kodiert, erzeugt durch Reduktion die möglicherweise von Yhm2p transportierten Moleküle Citrat, alpha-Ketoglutarat oder Succinat. Somit scheinen diese drei Gene alle an der Aufrechterhaltung des osmotischen

Zustands der Zelle über einen Austausch osmotisch wirksamer Stoffe zwischen den Mitochondrien und dem Cytosol beteiligt zu sein. Eine Aufklärung dieser Zusammenhänge wäre insbesondere deshalb von Interesse, da Mutationen in dem zu *YOR356W* homologen, menschlichen Gen *ETFDH* (53% Identität) zu einer vererbaren Erkrankung, der Glutarazidurie Typ II C führen (Finocchiaro *et al.*, 1988). Träger von Mutationen in diesem Gen besitzen spezielle vererbare Mißbildungen, die auf eine Azidose im Uterus zurückgeführt werden (Colevas *et al.*, 1988). Da jedoch entwicklungsbiologische Vorgänge häufig von Signaltransduktionswegen gesteuert werden, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit auch Untersuchungen in dieser Richtung sinnvoll erscheinen.

#### 4.5.2 Gene mit Funktion in der Zellwand

*FLO5*, *ASP3*, *YGP1* und *PHO11* (*PHO12*) codieren alle für Proteine, deren Funktion oder vermutete Funktion in direktem Zusammenhang mit der Zellwand steht. Flo5p ist ein lektinähnliches Protein, dessen Verteilung sich während des Zellzyklus dynamisch verändert und das bei der Zellteilung vornehmlich am Übergang zwischen Mutter- und Tochterzelle zu finden ist (Bony *et al.*, 1998). Da dies bei der Zellteilung der empfindlichste Bereich der Zelle ist, liegt die Vermutung nahe, daß ein Fehlen des Proteins eine Instabilität der Zellwand hervorruft, die wiederum eine Aktivierung des Pkc1p-Weges zur Folge hat. Die durch die drei anderen Gene kodierten Proteine werden alle sekretiert (Destruelle *et al.*, 1994; Barbaric *et al.*, 1980; Dunlop *et al.*, 1978) und üben wahrscheinlich eine wichtige enzymatische Funktion beim Aufbau der Zellwand aus. Dafür spricht auch, daß Ygp1p und Pho11p (bzw. Pho12p) insbesondere von Protoplasten sekretiert werden (Barbaric *et al.*, 1980; Pardo *et al.*, 1999), die gerade ihre Zellwand regenerieren. Somit kommt es wahrscheinlich bei Mutation eines dieser Gene zu Zellwandschäden, die durch den Pkc1p-Weg detektiert werden.

#### 4.5.3 Gene mit Funktion in der Regulation des Ionenhaushalts

Die Genprodukte, deren Funktion am einfachsten erklärt werden kann, sind die der *ENA*-Gene. Bei ihnen handelt es sich um P-Typ ATPasen, die insbesondere Natriumionen aus der Zelle heraustransportieren (Wieland *et al.*, 1995). Deletionen dieser Gene bewirken somit ein Ansteigen der intrazellulären Ionenkonzentration. Gegenüber dem umgebenden Medium kommt es so schnell zu einer hypoosmolaren Situation, wodurch der Pkc1p-Weg aktiviert wird. Offensichtlich scheint für diese Gene zudem eine Art Rückkopplungsregulation zu existieren, da Hardwick *et al.* (1999) eine Regulation der Transkription des *ENA*-Genclusters durch Tor2p, einen Aktivator von Pkc1p (Helliwell *et al.*, 1998a), nachweisen konnten.

#### 4.5.4 Gene mit Funktion im Vesikeltransport

Zwei der isolierten Gene besitzen möglicherweise eine Funktion im Vesikeltransport. Diese beiden Gene sind *GGAI* und *AGE1*. Gga1p interagiert mit einem GTP-bindenden Protein, einem sogenannten ARF (Zhdankina *et al.*, 2001). Für Age1p ist dies auf Grund seiner ARF-GAP Domäne ebenfalls anzunehmen. Womöglich führt die Mutation der beiden oben genannten Gene zu Störungen im Vesikeltransport. Dieser wird jedoch benötigt um Zellwandmaterial und Proteine, die für den Aufbau der Zellwand Verwendung finden, aus der Zelle zu transportieren. Somit kann die Zellwandsynthese nicht im benötigten Umfang ablaufen. Diese defekte Zellwand wird erneut vom Pkc1p-Weg wahrgenommen und die Aktivität des Reporterenzymes steigt an.

#### 4.5.5 Ein Gen mit einer Funktion im Inositolphosphatstoffwechsel

*FIG4* kodiert für eine Inositol-Polyphosphat-5-Phosphatase. Dies ist besonders interessant, wenn man bedenkt, daß mit *STT4* und *KCSI* bereits zwei weitere Gene bekannt sind, deren Enzyme im gleichen Stoffwechselweg aktiv sind (Yoshida *et al.*, 1994, Saiardi *et al.*, 1999). Eine *FIG4*-Überexpression komplementiert *sac1* („suppressor of actin“-)-Mutanten (Stolz *et al.*, 1998). Mutanten von *fig4* zeigen zudem Defekte bei der Paarung, da sie keine normalen Paarungsprojektionen ausbilden (Erdman *et al.*, 1998). Diese Phänotypen lassen sich gut mit einer möglichen Funktion des Genes bei der Regulation des Pkc1p-Weges in Einklang bringen. Zusammen mit der Funktion von *STT4* und *KCSI* scheint eine Regulation der Aktivität des Pkc1p-Weges durch Inositolpolyphosphate wahrscheinlich. Wie diese erfolgt, ist jedoch nicht offensichtlich. Eine Möglichkeit wäre die Bindung an und Aktivierung von Pkc1p selbst. Da durch die, in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse, eine Interaktion mit der C1-Domäne unwahrscheinlich ist, wäre dies nur an der C2-Domäne möglich. Eine Domäne für die bekannt ist, daß Inositolpolyphosphate mit ihr interagiert, ist die PH-Domäne („pleckstrin homology“, Schultz *et al.*, 1998). Eine solche Domäne findet sich z.B. in Rom2p (Ozaki *et al.*, 1996) und Bem2p (Schultz *et al.*, 1998). Beide Proteine haben eine GAP-Funktion, die möglicherweise auf Rho1p wirkt und somit eine regulatorische Funktion im Zusammenhang mit dem Pkc1p-Weg besitzt (Ozaki *et al.*, 1996, Cid *et al.*, 1998). Durch diese Verbindung ist es möglich, daß auch Fig4p eine regulatorische Funktion ausübt. Dies läßt weitere Untersuchungen in dieser Richtung sinnvoll erscheinen.

### 4.5.6 Gene mit unbekannter Funktion

*YJL105W*, *YJL017W* und *YNL152W* codieren für Proteine über deren Funktion bisher nichts bekannt ist. Auch eine Analyse der Sequenz auf funktionelle Domänen ergab keine Hinweise und es sind bisher auch keine homologen Proteine mit bekannter Funktion beschrieben. Dies macht sie aus zwei Gründen zu interessanten Studienobjekten. Zum einen kann eventuell eine neue Enzymklasse identifiziert werden. Zum anderen läßt die Tatsache, daß trotz einer fast vollständig vorliegenden humanen Genomsequenz (Venter *et al.*, 2001, Lander *et al.*, 2001) keine homologen Proteine in höheren Zellen existieren und die Proteine an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität beteiligt sind, diese als mögliche Angriffspunkte für Wirkstoffe mit fungizider Wirkung erscheinen.

Wie man sieht, überwiegen bei den erhaltenen Genen diejenigen, mit Funktionen in der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität. Die Gene, die an der Regulation des Ionenhaushalts beteiligt sind, nehmen hierbei eine doppelte Rolle ein, die sich z.B. in der rückgekoppelten Regulation der *ENA*-Gene äußert. Es ist unklar, ob die Gene reguliert werden oder selber Regulatoren sind. Mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließlich regulatorische Funktion hat *FIG4*. Die hier diskutierten Ergebnisse liefern jedoch nur erste Hinweise auf mögliche Funktionen der Gene und sollten als Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen dienen. Dies gilt insbesondere deshalb, weil für die isolierten Mutanten noch nicht nachgewiesen wurde, daß das Transposon lediglich einmal in das Genom integriert ist. Aus diesem Grund könnten die beobachteten Phänotypen auch durch zusätzliche Integrationen des Transposons hervorgerufen werden.

## 5. Zusammenfassung

Mitglieder der „Proteinkinase C Superfamilie“ sind an den verschiedensten mit Signalweiterleitung verbundenen Vorgängen in eukaryontischen Zellen beteiligt. Untersuchungen an dieser Enzymklasse werden durch die Existenz mehrerer Isoenzyme (bis zu 20) in höheren Zellen erschwert. Zudem finden sich in den verschiedenen Isoenzymen sowohl unterschiedliche als auch gleiche Domänen, die unterschiedliche Funktionen besitzen. Eine Sonderrolle nimmt hier die Proteinkinase C Pkc1p aus *Saccharomyces cerevisiae* ein. Dieses Protein vereint alle in Proteinen der „Proteinkinase C Superfamilie“ vorkommenden Domänen in sich und ist zudem das einzige Protein seiner Klasse im Proteom dieser Hefe. Es wird deshalb als Urahn der Proteine dieser Familie angesehen. Pkc1p reguliert über Phosphorylierung, sowohl einen klassischen MAP-Kinase-Weg als auch einige MAP-Kinase unabhängige Ziele. Mit Hilfe dieses Proteins als Modell wurde in dieser Arbeit exemplarisch die Funktion zweier PKC-Enzym-typischer Domänen untersucht.

Durch Analyse von Mutantenphänotypen, Enzymaktivitätstest und Interaktionsstudien konnte nachgewiesen werden, daß die Aktivierung von Pkc1p vornehmlich durch Interaktion der kleinen GTPase Rho1p mit der zweiten Wiederholung des Motives einer sogenannten „Cystein-reichen“-Domäne (C1) erfolgt. Durch Phänotypen von Punktmutanten wurde zudem gezeigt, daß der Argininrest an Position 483 wichtig für diesen Kontakt ist.

Ferner wurde durch den Austausch der „Cystein-reichen“ Region von Pkc1p gegen die homologen Bereiche der Raf-Kinase und der PKC  $\eta$  aus höheren Eukaryonten nachgewiesen, daß die Herstellung chimärer Proteine eine geeignete Methode zur Einordnung von Domänenfunktionen darstellt. Gleichzeitig zeigen die erhaltenen Ergebnisse, daß die „Cystein-reiche“ Region von Pkc1p und Raf-Kinase, im Gegensatz zu der aus PKC  $\eta$ , zur Bindung kleiner GTPasen befähigt ist.

Eine aminoterminaler Deletion von Pkc1p ergab Hinweise dafür, daß auch in diesem Bereich von Pkc1p eine Domäne mit regulatorischer Funktion existiert. Durch die Isolierung einer Mutanten in dieser Region und Phänotypentests sowie Interaktionsstudien mit Rho1p, konnte nachgewiesen werden, daß dieser, als HR1A bezeichnete Bereich, ebenfalls an der Aktivierung durch Rho1p partizipiert.

Aus den erhaltenen Ergebnissen wurde ein Modell aufgestellt, bei dem die Interaktion von Rho1p mit der „Cystein-reichen“-Domäne die MAP-Kinase abhängigen Funktionen und die Interaktion von Rho1p mit der HR1 Domäne die MAP-Kinase unabhängigen Ziele reguliert.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte eine Methode zur Isolierung von Genen entwickelt werden, die an der Aufrechterhaltung der zellulären Integrität beteiligt sind oder eine negative regulatorische Funktion auf den Pkc1p-Weg ausüben. Mit Hilfe dieser Methode konnten 15 verschiedene Mutanten isoliert werden. Von den betroffenen Genen ist nur für eines bislang eine Funktion in Zusammenhang mit der Pkc1p-abhängigen Signaltransduktion bekannt. Die Funktion der anderen Gene ist unbekannt. Für eines der Gene (*FIG4*) weisen die vorhandenen Daten allerdings auf eine negative, regulatorische Funktion im Pkc1p-Weg hin.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G. A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K. A., und Rosen, M. K. (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature* **399**, 379-383.
- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., und Stearns, T. (1997). 'Methods in yeast genetics-a Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.' (Cold Spring Harbor Laboratory Press:
- Akkaraju, G. R. und Basu, A. (2000). Overexpression of protein kinase C-eta attenuates caspase activation and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **279**, 103-107.
- 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.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., und Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215**, 403-410.
- Andrews, P. D. und Stark, M. J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J.Cell Sci.* **113** ( Pt 15), 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.
- Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Duran, A., und Perez, P. (1999). Schizosaccharomyces pombe protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J.Cell Sci.* **112** ( Pt 20), 3569-3578.
- Ayscough, K. R. und Drubin, D. G. (1998). A role for the yeast actin cytoskeleton in pheromone receptor clustering and signalling. *Curr.Biol.* **8**, 927-930.
- Baker, R. T. und Varshavsky, A. (1995). Yeast N-terminal amidase. A new enzyme and component of the N-end rule pathway. *J.Biol.Chem.* **270**, 12065-12074.
- Barbaric, S., Kozulic, B., Ries, B., und Mildner, P. (1980). Purification and evidence for heterogeneity of acid phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **95**, 404-409.
- 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.)
- Baymiller, J. und McCullough, J. E. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* cell lysis mutations *cly5* and *cly7* define temperature-sensitive alleles of PKC1, the gene encoding yeast protein kinase C. *Yeast* **13**, 305-312.
- Bell, R. M. und Burns, D. J. (1991). Lipid activation of protein kinase C. *J.Biol.Chem.* **266**, 4661-4664.
- Bienz, M. und Clevers, H. (2000). Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**, 311-320.
- Bishop, A. L. und Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* **348** Pt 2, 241-255.
- Blum, H., Beier, H., und Gross, H. G. (1987) Improved silverstaining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Boles, E. und Miosga, T. (1995). A rapid and highly efficient method for PCR-based site-directed mutagenesis using only one new primer. *Curr.Genet.* **28**, 197-198.
- Bony, M., Barre, P., und Blondin, B. (1998). Distribution of the flocculation protein, flof, at the cell surface during yeast growth: the availability of flof determines the flocculation level. *Yeast* **14**, 25-35.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., und McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**, 117-127.
- 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.
- 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.
- Burns, D. J. und Bell, R. M. (1991). Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J.Biol.Chem.* **266**, 18330-18338.
- 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.
- Caspi, S., Halimi, M., Yanai, A., Sasson, S. B., Taraboulos, A., und Gabizon, R. (1998). The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism. *J.Biol.Chem.* **273**, 3484-3489.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., und Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

- Chan, T. F., Carvalho, J., Riles, L., und Zheng, X. F. (2000). A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 13227-13232.
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S., und Toker, A. (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr.Biol.* **8**, 1069-1077.
- 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.
- Cid, V. J., Cenamor, R., Sanchez, 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** ( Pt 1), 25-36.
- Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N., und Knopf, J. L. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2<sup>+</sup>)- dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* **65**, 1043-1051.
- Coghlan, M. P., Chou, M. M., und Carpenter, C. L. (2000). Atypical protein kinases Clambda and -zeta associate with the GTP-binding protein Cdc42 and mediate stress fiber loss. *Mol.Cell Biol.* **20**, 2880-2889.
- Colevas, A. D., Edwards, J. L., Hruban, R. H., Mitchell, G. A., Valle, D., und Hutchins, G. M. (1988). Glutaric acidemia type II. Comparison of pathologic features in two infants. *Arch.Pathol.Lab Med.* **112**, 1133-1139.
- 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.
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., Francke, U., und Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **233**, 859-866.
- Csukai, M., Chen, C. H., De Matteis, M. A., und Mochly-Rosen, D. (1997). The coatomer protein beta'-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *J.Biol.Chem.* **272**, 29200-29206.
- Daub, M., Jockel, J., Quack, T., Weber, C. K., Schmitz, F., Rapp, U. R., Wittinghofer, A., und Block, C. (1998). The RafC1 cysteine-rich domain contains multiple distinct regulatory epitopes which control Ras-dependent Raf activation. *Mol.Cell Biol.* **18**, 6698-6710.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., und Klis, F. M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slr2/Mpk1 MAP kinase and in an Slr2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146** (Pt 9), 2121-2132.
- de Steensma, H. Y., de Jonge, P., Kaptein, A., und Kaback, D. B. (1989). Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: localization of a repeated sequence containing an acid phosphatase gene near a telomere of chromosome I and chromosome VIII. *Curr.Genet.* **16**, 131-137.
- Dekker, L. V., Parker, P. J., und McIntyre, P. (1992). Biochemical properties of rat protein kinase C-eta expressed in COS cells. *FEBS Lett.* **312**, 195-199.
- Delley, P. A. und Hall, M. N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of *RHO1*. *J.Cell Biol.* **147**, 163-174.
- 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.
- Desrivieres, S., Cooke, F. T., Parker, P. J., und Hall, M. N. (1998). *MSS4*, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**, 15787-15793.
- Destruelle, M., Holzer, H., und Klionsky, D. J. (1994). Identification and characterization of a novel yeast gene: the *YGPI* gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation. *Mol.Cell Biol.* **14**, 2740-2754.
- Dirick, L., Bohm, 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.
- Drgonova, 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.
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, 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. *Science* **272**, 277-279.
- Dunlop, P. C., Meyer, G. M., Ban, D., und Roon, R. J. (1978). Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **253**, 1297-1304.
- El Moulaj, B., Duyckaerts, C., Lamotte-Brasseur, J., und Sluse, F. E. (1997). Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 573-581.



- Emerson, S. D., Madison, V. S., Palermo, R. E., Waugh, D. S., Scheffler, J. E., Tsao, K. L., Kiefer, S. E., Liu, S. P., und Fry, D. C. (1995). Solution structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 and identification of its Ras interaction surface. *Biochemistry* **34**, 6911-6918.
- Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M., und Snyder, M. (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J. Cell Biol.* **140**, 461-483.
- 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.
- Esser, K., Scholle, B., und Michaelis, G. (1999). Disruption of six open reading frames on chromosome X of *Saccharomyces cerevisiae* reveals a cluster of four essential genes. *Yeast* **15**, 921-933.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Finocchiaro, G., Ito, M., Ikeda, Y., und Tanaka, K. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the alpha- subunit of human electron transfer flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **263**, 15773-15780.
- Flynn, P., Mellor, H., Palmer, R., Panayotou, G., und Parker, P. J. (1998). Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the Hr1 repeat motif. *J. Biol. Chem.* **273**, 2698-2705.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Duran, A., und Roncero, C. (2000). Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (*HOG*) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* *HOG* pathway under noninducing conditions. *J. Bacteriol.* **182**, 2428-2437.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., und Woods, R. A. (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360.
- 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. *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.
- 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.)
- Hannun, Y. A., Loomis, C. R., und Bell, R. M. (1985). Activation of protein kinase C by Triton X-100 mixed micelles containing diacylglycerol and phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* **260**, 10039-10043.
- Hardwick, J. S., Kuruvilla, F. G., Tong, J. K., Shamji, A. F., und Schreiber, S. L. (1999). Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 14866-14870.
- Heinisch, J. J. (1993). *PFK2*, *ISP42*, *ERG2* and *RAD14* are located on the right arm of chromosome XIII. *Yeast* **9**, 1103-1105.
- 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.
- Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., Totty, N. F., und . (1992). Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* **70**, 419-429.
- 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.
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., und Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**, 215-219.
- House, C. und Kemp, B. E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* **238**, 1726-1728.
- Hoyos, B., Imam, A., Chua, R., Swenson, C., Tong, G. X., Levi, E., Noy, N., und Hammerling, U. (2000). The cysteine-rich regions of the regulatory domains of raf and protein kinase C as retinoid receptors. *J. Exp. Med.* **192**, 835-846.

- Huang, K. N. und Symington, L. S. (1995). Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene *PTCI* and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics* **141**, 1275-1285.
- Huang, K. P., Nakabayashi, H., und Huang, F. L. (1986). Isozymic forms of rat brain  $\text{Ca}^{2+}$ -activated and phospholipid-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **83**, 8535-8539.
- Hurley, J. H., Newton, A. C., Parker, P. J., Blumberg, P. M., und Nishizuka, Y. (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* **6**, 477-480.
- Ichikawa, S., Hatanaka, H., Takeuchi, Y., Ohno, S., und Inagaki, F. (1995). Solution structure of cysteine-rich domain of protein kinase C alpha. *J.Biochem.* **117**, 566-574.
- 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.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K., und Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J.Biol.Chem.* **273**, 9656-9666.
- Imam, A., Hoyos, B., Swenson, C., Levi, E., Chua, R., Viriya, E., und Hammerling, U. (2000). Retinoids as ligands and coactivators of protein kinase C alpha. *FASEB J.* **15**, 28-30.
- 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., 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.
- Ishii, H., Koya, D., und King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J.Mol.Med.* **76**, 21-31.
- 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.
- Johannes, F. J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P., und Pfizenmaier, K. (1994). PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J.Biol.Chem.* **269**, 6140-6148.
- Johnson, L. N., Lowe, E. D., Noble, M. E., und Owen, D. J. (1998). The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett.* **430**, 1-11.
- Jöckel, J. (1999) Aktivierung von Pkc1p durch Rho1p in *Saccharomyces cerevisiae* durch Interaktion der Rho1p-Kerneffektorregion mit der Pkc1p C1B-Domäne. *Dissertation*.
- 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., 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.
- Kazanietz, M. G., Barchi, J. J., Omichinski, J. G., und Blumberg, P. M. (1995). Low affinity binding of phorbol esters to protein kinase C and its recombinant cysteine-rich region in the absence of phospholipids. *J.Biol.Chem.* **270**, 14679-14684.
- 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.
- Kikkawa, U., Kishimoto, A., und Nishizuka, Y. (1989). The protein kinase C family: heterogeneity and its implications. *Annu.Rev.Biochem.* **58**, 31-44.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R., und Nishizuka, Y. (1983). Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J.Biol.Chem.* **258**, 11442-11445.

- Kiley, S. C. und Parker, P. J. (1995). Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J.Cell Sci.* **108** ( Pt 3), 1003-1016.
- 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.
- Knopf, J. L., Lee, M. H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M., und Bell, R. M. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* **46**, 491-502.
- 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.
- Konig, B., DiNitto, P. A., und Blumberg, P. M. (1985). Stoichiometric binding of diacylglycerol to the phorbol ester receptor. *J.Cell Biochem.* **29**, 37-44.
- Kopecka, 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.
- Koradi, R., Billeter, M., und Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J.Mol.Graph.* **14**, 51-32.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., et al. und Pan (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. International Human Genome Sequencing Consortium. *Nature* **409**, 860-921.
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., und Parker, P. J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-2045.
- 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.
- Lemmon, S. K. und Traub, L. M. (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr.Opin.Cell Biol.* **12**, 457-466.
- 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.
- 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.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., III, 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.
- Lorberg, A. (2000) Untersuchungen zur Regulation der Zellintegrität in Hefen. *Dissertation*.
- 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.
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K., und Hakoshima, T. (1999). The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol.Cell* **4**, 793-803.
- Marcus, G. A., Silverman, N., Berger, S. L., Horiuchi, J., und Guarente, L. (1994). Functional similarity and physical association between *GCN5* and *ADA2*: putative transcriptional adaptors. *EMBO J.* **13**, 4807-4815.

- 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.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., und Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **275**, 1511-1519.
- Massague, J., Blain, S. W., und Lo, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103**, 295-309.
- 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.
- Mayor, J. A., Kakhniashvili, D., Gremse, D. A., Campbell, C., Kramer, R., Schroers, A., und Kaplan, R. S. (1997). Bacterial overexpression of putative yeast mitochondrial transport proteins. *J.Bioenerg.Biomembr.* **29**, 541-547.
- Mazur, P. und Baginsky, W. (1996). In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J.Biol.Chem.* **271**, 14604-14609.
- Mellor, H., Flynn, P., Nobes, C. D., Hall, A., und Parker, P. J. (1998). PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *J.Biol.Chem.* **273**, 4811-4814.
- Mellor, H. und Parker, P. J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem.J.* **332** ( Pt 2), 281-292.
- 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.
- Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* **268**, 247-251.
- Moser, B. A., Brondello, J. M., Baber-Furnari, B., und Russell, P. (2000). Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Mol.Cell Biol.* **20**, 4288-4294.
- Mott, H. R., Carpenter, J. W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R. M., und Campbell, S. L. (1996). The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 8312-8317.
- Mott, H. R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P. N., Manser, E., Lim, L., und Laue, E. D. (1999). Structure of the small G protein Cdc42 bound to the GTPase-binding domain of ACK. *Nature* **399**, 384-388.
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., und Lusty, C. J. (1986). Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**, 299-310.
- Nassar, N., Horn, G., Herrmann, C., Scherer, A., McCormick, F., und Wittinghofer, A. (1995). The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* **375**, 554-560.
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F. J., Songyang, Z., und Cantley, L. C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J.Biol.Chem.* **272**, 952-960.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**, 693-698.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665.
- 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.
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kuno, T., Tanaka, C., Kikkawa, U., und Nishizuka, Y. (1989). Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 4868-4871.
- Orengo, C. A., Michie, A. D., Jones, S., Jones, D. T., Swindells, M. B., und Thornton, J. M. (1997). CATH-a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure*. **5**, 1093-1108.
- Ostanin, K., Harms, E. H., Stevis, P. E., Kuciel, R., Zhou, M. M., und Van Etten, R. L. (1992). Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J.Biol.Chem.* **267**, 22830-22836.

- 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.
- Palmer, R. H., Ridden, J., und Parker, P. J. (1994). Identification of multiple, novel, protein kinase C-related gene products. *FEBS Lett.* **356**, 5-8.
- Palmer, R. H., Ridden, J., und Parker, P. J. (1995). Cloning and expression patterns of two members of a novel protein-kinase-C-related kinase family. *Eur.J.Biochem.* **227**, 344-351.
- 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.
- Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sanchez, M., Gil, C., und Nombela, C. (1999). Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**, 459-472.
- Parekh, D. B., Ziegler, W., und Parker, P. J. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* **19**, 496-503.
- 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.
- Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D., und Ullrich, A. (1986). The complete primary structure of protein kinase C-the major phorbol ester receptor. *Science* **233**, 853-859.
- Pears, C. J., Kour, G., House, C., Kemp, B. E., und Parker, P. J. (1990). Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur.J.Biochem.* **194**, 89-94.
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., und Sudhof, T. C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* **345**, 260-263.
- Philip, B. und Levin, D. E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol.Cell Biol.* **21**, 271-280.
- Plant, P. J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P., und Rotin, D. (1997). The C2 domain of the ubiquitin protein ligase Nedd4 mediates Ca<sup>2+</sup>-dependent plasma membrane localization. *J.Biol.Chem.* **272**, 32329-32336.
- 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.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., und Narumiya, S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J.Biol.Chem.* **271**, 13556-13560.
- Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H., und Lee, S. Y. (1989). Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* **244**, 546-550.
- Rizo, J. und Sudhof, T. C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J.Biol.Chem.* **273**, 15879-15882.
- 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.
- Ron, D. und Kazanietz, M. G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* **13**, 1658-1676.
- Roncero, C. und Duran, 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. *Nat.Biotechnol.* **16**, 939-945.
- Ruden, D. M., Ma, J., Li, Y., Wood, K., und Ptashne, M. (1991). Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**, 250-252.
- Saiardi, A., Erdjument-Bromage, H., Snowman, A. M., Tempst, P., und Snyder, S. H. (1999). Synthesis of diphosphoinositol pentakisphosphate by a newly identified family of higher inositol polyphosphate kinases. *Curr.Biol.* **9**, 1323-1326.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). 'Molecular Cloning - A Laboratory Manual.' 2nd Edn. (Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.)
- Sayers, L. G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T., und Parker, P. J. (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells* **5**, 17-27.

- 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.
- 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.
- Shao, X., Davletov, B. A., Sutton, R. B., Sudhof, T. C., und Rizo, J. (1996). Bipartite Ca<sup>2+</sup>-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* **273**, 248-251.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J.Mol.Biol.* **98**, 503-517.
- Spee, J. H., de Vos, W. M., und Kuipers, O. P. (1993). Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res.* **21**, 777-778.
- 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.
- Steenbergen, J. M. und Fay, F. S. (1996). The quantal nature of calcium release to caffeine in single smooth muscle cells results from activation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2<sup>+</sup>)-ATPase. *J.Biol.Chem.* **271**, 1821-1824.
- Stirling, D. A. und Stark, M. J. (2000). Mutations in *SPC110*, encoding the yeast spindle pole body calmodulin-binding protein, cause defects in cell integrity as well as spindle formation. *Biochim.Biophys.Acta* **1499**, 85-100.
- Stolz, L. E., Kuo, W. J., Longchamps, J., Sekhon, M. K., und York, J. D. (1998). *INP51*, a yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers a cold-resistant phenotype. *J.Biol.Chem.* **273**, 11852-11861.
- Struhl, K., Stinchcomb, D. T., Scherer, S., und Davis, R. W. (1979). High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 1035-1039.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Sudhof, T. C., und Sprang, S. R. (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca<sup>2+</sup>/phospholipid-binding fold. *Cell* **80**, 929-938.
- Symons, M. (1996). Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem.Sci.* **21**, 178-181.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., und Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J.Biol.Chem.* **252**, 7603-7609.
- Torres, L., Martin, H., Garcia-Saez, M. I., Arroyo, J., Molina, M., Sanchez, M., und Nombela, C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol.Microbiol.* **5**, 2845-2854.
- Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G. A., Ladner, M., Long, C. M., Crosier, W. J., Watt, K., Koths, K., und . (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* **242**, 1697-1700.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., und Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**, 623-627.
- Valverde, A. M., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J., und Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 8572-8576.
- Van Aelst, L. und D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* **11**, 2295-2322.
- Vannini, G. L., Pancaldi, S., Poli, F., und Dall'Olio, G. (1987). Exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae* treated with congo red. *Cytobios* **49**, 89-97.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., et al. und Nodell, M. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- 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.
- Vitale, N., Moss, J., und Vaughan, M. (1998). Molecular characterization of the GTPase-activating domain of ADP-ribosylation factor domain protein 1 (ARD1). *J.Biol.Chem.* **273**, 2553-2560.
- 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, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A., und Narumiya, S. (1996). Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho. *Science* **271**, 645-648.

- 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 (Slr2) 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 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2615-2623.
- West, A. G. und Sharrocks, A. D. (1999). MADS-box transcription factors adopt alternative mechanisms for bending DNA. *J.Mol.Biol.* **286**, 1311-1323.
- Wickner, R. B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**, 566-569.
- 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.
- Wieland, J., Nitsche, A. M., Strayle, J., Steiner, H., und Rudolph, H. K. (1995). The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. *EMBO J.* **14**, 3870-3882.
- Winzler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Davis, R. W., und . (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906.
- Wyrick, J. J., Holstege, F. C., Jennings, E. G., Causton, H. C., Shore, D., Grunstein, M., Lander, E. S., und Young, R. A. (1999). Chromosomal landscape of nucleosome-dependent gene expression and silencing in yeast. *Nature* **402**, 418-421.
- 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.
- 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.
- Yedovitzky, M., Mochly-Rosen, D., Johnson, J. A., Gray, M. O., Ron, D., Abramovitch, E., Cerasi, E., und Neshier, R. (1997). Translocation inhibitors define specificity of protein kinase C isoenzymes in pancreatic beta-cells. *J.Biol.Chem.* **272**, 1417-1420.
- 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.
- Yoshida, S., Ohya, Y., Goebel, M., Nakano, A., und Anraku, Y. (1994). A novel gene, *STT4*, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **269**, 1166-1172.
- Zamenhof, S. (1957). Preparation and assay of deoxyribonucleic acid from animal tissue. *Methods Enzymol.* **3**, 696-704.
- Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M., und Hurley, J. H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* **81**, 917-924.
- Zhdankina, O., Strand, N. L., Redmond, J. M., und Boman, A. L. (2001). Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. *Yeast* **18**, 1-18
- 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
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>HOC1</i>	"homologous to <i>OCH1</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
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
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
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S.cerevisiae</i> , <i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin
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- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
YEPD	"Yeast extract-Pepton-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

Danke,..

..Herrn Prof. Dr. Jürgen Heinisch für die Betreuung der Arbeit, das Überlassen des Themas und die Diskussionsbereitschaft.

..Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner für die freundliche Übernahme des Koreferates.

..Herrn Prof. Dr. Johannes Hegemann für die freundliche Übernahme des leider sehr kurzfristig erforderlichen zusätzlichen Koreferates.

..den ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe: Anja Lorberg, Stefanie Huppert, Ute Gengenbacher, Jörg Jacoby, Sigrid Nilius, Anja Strauß und Mehmet Saltürk für die gute Zusammenarbeit.

..allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

..der Mittagsrunde für erheiternde Mittagspausen.

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

..Johannes Jöckel für die fruchtbare Kooperation.

..meinen Eltern dafür, daß sie mir ermöglicht haben diesen Weg zu gehen.

..meinem Bruder, insbesondere für das Bereitstellen von Bandweite.

..Anja Lorberg, dafür, daß sie für mich da 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, 2. April 2001

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

Referent: Prof. Dr. Jürgen Heinisch

Korreferenten: Prof. Dr. Rolf Wagner, Prof. Dr. Johannes Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2001