

**Untersuchungen zur Modifikation von Ste50p in
der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Igo Siegurd Spode

Düsseldorf, Dezember 2003

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

Referent: Prof. Dr. C.P. Hollenberg

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Zweiter Koreferent: PD Dr. M. Ramezani-Rad

Tag der mündlichen Prüfung: 29.1.2004

1	EINLEITUNG	7
1.1	Signaltransduktion	7
1.2	G-Proteine und Signaltransduktionswege	7
1.3	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kaskaden	8
1.4	MAPK-Wege der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.4.1	Der Pheromonantwortweg zur Vorbereitung der Paarung	11
1.4.2	Der Hog1-vermittelte Osmostress-Antwortweg	12
1.5	Gemeinsam verwendete Proteine	13
1.6	Die Funktion von Ste50 bei der Signaltransduktion	15
1.7	Zielsetzung	20
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Chemikalien und Enzyme	21
2.2	Stämme	21
2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	21
2.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Basisstämme	21
2.3	Medien	22
2.3.1	Medien <i>E. coli</i>	22
2.3.2	Medien <i>S. cerevisiae</i>	22
2.4	Plasmide	23
2.4.1	Verwendete Plasmide	23
2.4.2	Für diese Arbeit konstruierte Plasmide	24
2.4.3	AS-Austausche durch gezielte PCR-Mutagenese und PCR-Assembly	26
2.5	PCR (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaktion)	27
2.5.1	Verwendete Oligonucleotide	27
2.6	Zufällige PCR-Mutagenese	29
2.7	Transformation	29

2.7.1	Transformation in <i>S. cerevisiae</i>	29
2.7.2	Transformation in <i>E. coli</i>	30
2.8	Präparation von Nukleinsäuren	31
2.8.1	Minipräparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)	31
2.8.2	Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	31
2.8.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	31
2.9	Auftrennung von DNA-Fragmenten (elektroph.)	32
2.10	Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	32
2.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
2.12	Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse	32
2.13	Herstellung von Proteinrohextrakten	32
2.14	Herstellung von affinitätsgereinigtem Ste50 für SDS-PAGE	33
2.15	Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität	33
2.15.1	Quantitative Bestimmung mit ONPG	33
2.15.2	Semiquantitative Bestimmung (X-Gal-Overlay)	34
2.16	Proteinbestimmung nach Bradford	34
2.17	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.18	Detektion von Proteinen im SDS-Gel	35
2.18.1	Silberfärbung	35
2.18.2	Coomassie-Färbung	35
2.18.3	Phosphoprotein-Anfärbung im Gel	36
2.19	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblots)	36
2.19.1	Immuno-Detektion durch alkalische Phosphatase	36
2.19.2	Immuno-Detektion mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper (LumiLight)	36
2.20	Antikörper	37
2.21	Aufreinigung von GST-Ste50 im Liter-Maßstab	37
2.22	Protein-Dephosphorylierung mit CIP	38

2.23	Massenspektroskopie	38
2.24	Induktion des Paarungspheromonantwortweges mit α-Faktor	38
2.25	Sensitivitätstest gegenüber Hyperosmolarität	39
2.26	Immunpräzipitation	39
2.27	Two-Hybrid-Interaktionsnachweis	39
3	ERGEBNISSE	41
A)	Charakterisierung der Ste50-RA-Domäne	41
3.1	Etablierung eines Funktionalitätstests für die RAD	41
3.2	Mutagenese der RAD	44
3.3	Charakterisierung der RAD-Mutanten	47
3.4	Identifizierung von RAD-Interaktionspartnern im Two-Hybrid-Assay	48
3.4.1	Analyse der Interaktion der Ste50-RA-Mutanten mit Cdc42	48
3.4.2	Analyse der Interaktion der Ste50-RA-Mutanten mit Gic1	50
B)	Die Modifizierung von Ste50	51
3.5	GST-Ste50 wird phosphoryliert	52
3.6	Gezielte Mutagenese von potentiellen Phosphorylierungsstellen in Ste50	57
3.7	Massenspektroskopie	57
3.8	Phosphorylierungsstatus von Ste50-3A (S196A S198A S202A)	64
3.9	Analyse der Proteinstabilität von Ste50-3A im Vergleich zu WT-Ste50	66
3.10	Phänotypische Charakterisierung der Ste50-3A-Mutante im Signaltransduktionsweg der Pheromon-Antwort	68
3.11	Auswirkungen von Ste50-3A auf die Osmostressantwort	72
4	DISKUSSION	74
4.1	Etablierung eines Funktionstests für die RA-Domäne von Ste50	74

4.2	RA-abhängige Interaktionspartner von Ste50	78
4.3	Die Modifizierung von Ste50	79
4.4	GST-Ste50 wird bei Induktion des Pheromonantwortweges vermehrt phosphoryliert	81
4.5	Massenspektroskopische Analyse von Ste50	82
4.6	Potentielle Phosphorylierungsstellen in Ste50	83
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	LITERATUR	89
7	ABKÜRZUNGEN	106

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Die Umweltbedingungen ändern sich ständig sowohl im makroskopischen Raum (Tag/Nacht-Zyklus; Klimaschwankungen) als auch im mikroskopischen Bereich (Änderung der Nährstoffzusammensetzung, Anhäufung toxischer Substanzen, Stress). Daraus folgt zwingend eine notwendige Fähigkeit lebendiger Organismen zur Anpassung an veränderte Umstände. Dazu gehört 1. die Wahrnehmung der Umgebung, 2. die Weiterleitung der Information bis zur Auswertung sowie darauf folgend 3. eine (sinnvolle) Reaktion auf die veränderten Bedingungen. Diese Kette wird unter dem Begriff der Signaltransduktion zusammengefasst und lässt sich für Einzeller folgendermaßen erklären:

Auf der Wahrnehmungsebene befindet sich ein Rezeptor auf der Oberfläche der Zelle, welcher ein definiertes Molekül (Signal) bindet und sich dadurch strukturell verändert. Die Übermittlung dieser Information ins Zellinnere erfolgt entweder durch Rezeptorinternalisierung (Endozytose) oder bei membrangängigen Rezeptoren durch eine Strukturänderung im Zellinneren, welche die Aktivierung einer enzymatischen Funktion bewirkt.

Am Ende der Kaskade steht (meist) die Aktivierung eines Transkriptionsfaktors, welcher im Zellkern die evolutionär festgelegte Antwort in Form der An- oder Abschaltung ganzer Gen-Gruppen auslöst.

Für Einzeller erfolgt die Informationsverarbeitung nicht nur im Zellkern, sondern auch während der Informationsweiterleitung durch die Verschaltung vieler Wege untereinander mit gegenseitiger Verstärkung oder Abschwächung, ähnlich wie bei neuronalen Verstärker-Kaskaden im Gehirn. Dabei spielen häufig auch allgemeine Informationen zum Zustand der Zelle (z.B. ATP-Spiegel oder Reduktionsäquivalente) eine Rolle.

1.2 G-Proteine und Signaltransduktionswege

Im Laufe der Evolution sind verschiedene Mechanismen der Signaltransduktion entwickelt worden. Einer der am häufigsten verwendeten betrifft die Signalvermittlung durch die Klasse der Sieben-Transmembran-Rezeptoren (STMR), welche kleine GTP-bindende Proteine (G-Proteine) aktivieren (Hadley, 1988). G-Proteine binden GTP unter Zuhilfenahme von GDP-GTP-Austausch-Faktoren (GEF's) und hydrolysieren das GTP wieder zu GDP, unterstützt von GTPase aktivierenden Proteinen (GAP's). Die GTP-Form ist die aktive.

Man unterscheidet heterotrimere und monomere G-Proteine. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer G_α -Untereinheit und einer $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit (Gilman, 1987; Hepler and Gilman, 1992). Sowohl G_α als auch $G_{\beta\gamma}$ können als Signalvermittler auftreten, wobei die

Signaldauer von der GTPase-Aktivität der G_{α} -Untereinheit abhängig ist (Kim *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1992). $G_{\beta\gamma}$ erhöht die Affinität von G_{α} für GDP um einen Faktor von etwa 100, was den inaktiven Zustand des G-Proteins stabilisiert (Higashijima *et al.*, 1987). G_{α} und $G_{\beta\gamma}$ können divergente Signale erzeugen, wenn sie verschiedene Effektoren ansprechen oder konvergente bei gleichem Effektor. Sie können in einer Signaltransduktion aktivierend und inhibierend wirken. Die Untereinheiten verschiedener G-Proteine können untereinander funktionell austauschbar sein und dadurch mehrere Effektoren gleichzeitig ansprechen (Linder and Gilman, 1992; Clapham and Neer, 1993). G-Proteine sind in beinahe allen Eukaryonten an Signaltransduktionswegen beteiligt. Die Superfamilie der kleinen monomeren G-Proteine umfasst mehr als 100 Mitglieder und wird in mindestens 5 Familien aufgeteilt. *S. cerevisiae* stellt in der Familie der Ras-Proteine u.a. Ras1 und Ras2 sowie in der Rho-Familie Rho1 bis Rho4 und Cdc42 (Takai *et al.*, 2001).

1.3 Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kaskaden

Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kaskaden, kurz MAPK-Kaskaden, sind das am häufigsten anzutreffende Signaltransduktions-Modul unterhalb der Ebene der G-Proteine. Man findet sie außer in *S. cerevisiae* auch in anderen Pilzen (Errede *et al.*, 1995; Herskowitz 1995), Pflanzen (Hirt 1997) und Tieren (Cooper, 1994). Die Basiskaskade besteht aus drei aufeinander folgenden Proteinkinasen. Die erste, MAP-Kinase-Kinase-Kinase oder kurz MAPKKK, phosphoryliert bei Aktivierung der Kaskade die MAPKK, welche ihrerseits die MAP-Kinase durch Phosphorylierung aktiviert. Die MAP-Kinase phosphoryliert zumeist Transkriptionsfaktoren, die dann die Transkription ganzer Gengruppen beeinflussen, z.B. in *S. cerevisiae* mehrere hundert bis zu 1400 Gene im Fall von Gcn4 (Hinnebusch & Natarajan, 2002), ein Viertel des Genoms! Mittlerweile wurden viele PAK (P21 activated protein kinase) zwischen der G-Protein-Ebene und der MAPKKK identifiziert, sie werden auch als MAPK₄ bezeichnet.

Biochemisch am besten aufgeklärt ist die Funktion der Basiskaskade (Robinson & Cobb, 1997). Die MAPKKK besitzt eine regulatorische Domäne am N-Terminus und eine Kinase-Domäne am C-Terminus. Bei Aktivierung phosphoryliert diese die MAPKK an einem Serin und einem Threonin in einer konservierten N-terminalen Domäne. Die dadurch aktivierte MAPKK phosphoryliert nun ihrerseits ein nur durch eine Aminosäure getrenntes Tyrosin und ein Threonin der Aktivierungs-Schleife (Johnson *et al.*, 1996) der konservierten Kinase-Domäne der MAPK, die so wiederum aktiviert wird. Es zeigt sich aber immer deutlicher, dass die Kaskade-Module in makromolekulare Komplexe mit Anker-, Gerüst- und Adapter-Proteinen eingebettet sind, die trotz gleicher beteiligter Proteine bei unterschiedlichen hereinkommenden Informationen erst die eigentliche Signalidentität bewirken und

unterschiedliche Ausgangs-Signale liefern (Gustin *et al.*, 1998; Ptashne & Gann, 2003; Park *et al.*, 2003). Dies wurde besonders für die Rekrutierung des Kinase-Moduls über das Gerüstprotein Ste5 gezeigt: Eine artifizielle, gezielte Verankerung von Ste5 an der Plasmamembran durch Myrestylierung war ausreichend, um eine Antwort auszulösen, selbst wenn Pheromonrezeptor und das assoziierte G-Protein fehlten (Pryciak & Huntress 1998). Neue Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Gerüstproteine wie Ste5 oder Pbs2 in funktioneller Hinsicht erkennbare Ähnlichkeiten mit Promotoren aufweisen: Beide sind modulare und flexible Organisationszentren, die den Informations-Fluss bei Signaltransduktion bzw. Transkription kontrollieren (Park *et al.*, 2003; Ferrell & Cimprich, 2003). Entscheidend für die Informationserhaltung sind also nicht so sehr die Proteine der eigentlichen Kaskade als vielmehr die temporär und lokal gerade anzutreffenden Interaktionspartner! Diese Interaktionspartner, wie z.B. das Adaptorprotein Ste50 (Ramezani-Rad, 2003), sind also notwendig, um die Orientierung und/oder stereochemische Regulierung der Kinase-Module zu ermöglichen. Dabei spielen vielfach post-translationale Modifikationen der regulierenden Proteine eine entscheidende Rolle.

Phosphorylierung ist einer der am meisten verwendeten Modifikations-Mechanismen zur Regulation von Protein-Funktionen in Eukaryonten (Cohen 1992; Hubbard & Cohen 1993). In *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* gehören Proteinkinasen zu den Proteinfamilien mit den meisten Vertretern. In allen drei Organismen stellen sie 2 % des Proteoms dar (Rubin *et al.*, 2000). Wahrscheinlich enthalten bis zu 30 % aller zellulären Proteine kovalent gebundenes Phosphat, ein abnormer Phosphorylierungsgrad ist eine der Ursachen oder Konsequenzen häufiger Krankheiten, wie Krebs, Diabetes, Alzheimer oder rheumatischer Arthritis (Cohen 2000). Die Modifikation durch einen Phosphatrest kann ganz unterschiedliche Auswirkungen auf das Zielprotein haben. Sehr häufig reguliert Phosphorylierung die Aktivität von Enzymen (Gabrielli *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Davis 2000). Des Weiteren werden sowohl die Stabilität (Szilak *et al.*, 1997; Nosworthy *et al.*, 1998; Brondello *et al.*, 1999) als auch die Fähigkeit zur Wechselwirkung mit anderen Proteinen (Di Paolo *et al.*, 1997; Kann *et al.*, 1999) oder DNA (Steegenga *et al.*, 1996), zur Bindung von Metallionen (Taborsky, 1991) oder zur Translokation zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten (Jans, 1995; Petersen *et al.*, 1999) durch Phosphorylierung beeinflusst. Es sind verschiedene Proteine und Proteindomänen bekannt, die ihre Bindungspartner innerhalb zellulärer Signalkaskaden nur in phosphorylierter Form erkennen (Yaffe & Cantley, 1999; Yaffe & Elia, 2001; Yaffe & Smerdon, 2001). Bekannte Beispiele für solche spezifischen Module sind die SH2-Domänen (Schaffhausen 1995), WW-Domänen (Lu *et al.*, 1999b), FHA-Domänen (Durocher *et al.*, 2000) oder 14-3-3 Proteine (Aitken 1996; Yaffe *et al.*, 1997a).

1.4 MAPK-Wege der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

In der Bäckerhefe sind fünf Signalwege mit MAPK-Kaskaden etabliert:

1. Pheromonantwortweg zur Vorbereitung der Paarung
2. Weg für pseudohyphales Wachstum bei Nahrungsmangel (Stickstoff/Glukose)
3. Osmostress-Antwortweg (HOG=high osmolarity glycerol)
4. der Zellwandintegritätsweg mit Protein-Kinase C
5. der Smk1-Sporenwandsyntheseweg (nur in sporulierenden Zellen)

Ein sechster Weg wurde vorgeschlagen, der SVG (sterile vegetative growth)-Weg, bestehend aus Sho1 → Ste20 → Ste50 → Ste11 → Ste7 → Kss1 → Ste12 (Lee und Elion, 1999; Cullen *et al.*, 2000).

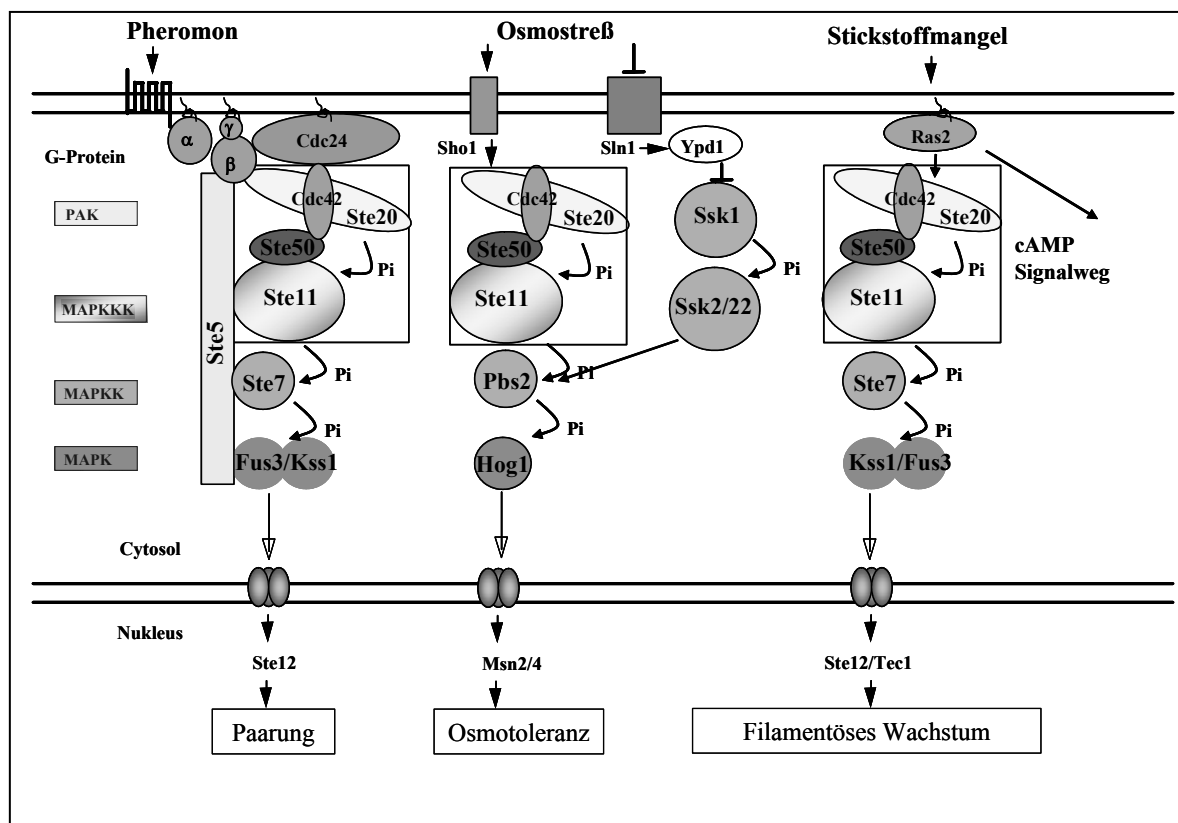


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Signalwege für die Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums oder der Pseudohyphenbildung und dem Signalweg zur Anpassung an hyperosmolare Stressbedingungen. Die eingerahmten Proteine sind in allen Signalwegen beteiligt. Weitere Einzelheiten siehe Text.

1.4.1 Der Pheromonantwortweg zur Vorbereitung der Paarung

Der Pheromonantwortweg (siehe Abbildung 1.1) ist für Konjugation und Paarung wichtig (Leberer *et al.*, 1997a). Nach Bindung des Paarungspheromons an seinen zugehörigen Rezeptor (Ste2 oder Ste3) wird das heterotrimere G-Protein, bestehend aus G_α (Gpa1), G_β (Ste4) und G_γ (Ste18), aktiviert (Elion 2000). Der $G_{\beta\gamma}$ -Komplex ist verantwortlich für die Signaltransduktion zu Ste11 über einen Weg mit Cdc42, Ste20, Ste50 und ein Gerüstprotein, Ste5 (Simon *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996; Pryciak & Huntress 1998; Moskow *et al.*, 2000; Elion 2001; Lamson *et al.*, 2002). Ste20 gehört zur Klasse der PAK-Proteine und phosphoryliert Ste11 (van Drogen & Peter, 2000). In der Gegenwart des Paarungspheromons bindet Ste5 an G_β und ermöglicht dadurch vermutlich die Aktivierung von Ste11 durch Ste20 (Leeuw *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1998). G_β scheint eine Rekrutierung von Ste5 an die Plasmamembran zu bewirken (Pryciak & Huntress 1998, Park *et al.*, 2003). Sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Paarungspheromons bindet Ste5 die MAPKKK Ste11, die MAPKK Ste7 und die MAP-Kinase Fus3 in einem Komplex hohen Molekulargewichtes (Choi *et al.*, 1994; Marcus *et al.*, 1994; Printen & Sprague 1994). Die aktivierte MAP-Kinase aktiviert ihrerseits letztendlich den Transkriptionsfaktor Ste12, welcher die Transkription pheromon-induzierter Gene auslöst, die, wie z.B. *FUS1*, für paarungsnotwendige Proteine kodieren. Ste50 ist mit Ste11 assoziiert und bewirkt eine Aufrechterhaltung der Pheromon-induzierten Signaltransduktion (Xu *et al.*, 1996). Die Inaktivierung von *STE50* bewirkt eine Abschwächung der Paarungspheromon-abhängigen Signaltransduktion in haploiden Zellen. Die Menge an Ste50 scheint ein limitierender Faktor für die Aufrechterhaltung des Pheromon-induzierten Zellzyklusarrestes zu sein, da die Überexpression von *STE50* die Dauer des Zellzyklus-Arrestes verlängert und die morphologische Veränderung in dieser Phase der Paarung verstärkt. Die Überexpression von *STE50* bewirkt auch eine Hypersensitivität gegen α -Pheromon, während *STE50*-Deletionsmutanten eine stark reduzierte und veränderte Antwort auf Paarungspheromon zeigen (Xu *et al.*, 1996). Es wurde postuliert, dass Ste50 Ste11 in Bezug auf die Paarungspheromon-Antwort möglicherweise sowohl positiv als auch negativ reguliert (Norman *et al.*, 1999).

1.4.2 Der Hog1-vermittelte Osmostress-Antwortweg

In wachsenden Zellen gibt es entlang der Plasmamembran einen Konzentrationsgradienten zwischen interner Osmolarität und externen osmolaren Bedingungen, der zu einem Wassereinstrom in die Zelle führt. Dieser Einstrom führt bei der Hefezelle zu einer Zunahme des Zellvolumens und damit zu der Entstehung von Turgor. Die Ursache für die Entstehung von Turgor ist der Gegendruck, der aus der nur begrenzten Dehnbarkeit der Zellwände resultiert. Bei geänderten osmolaren Wachstumsbedingungen ist es für das Überleben der Zellen essentiell, diese Veränderungen wahrzunehmen und darauf zu reagieren.

In der Hefe *S. cerevisiae* vermittelt der *HOG*-(high osmolarity glycerol) MAP-Kinase-Weg die Reaktion auf die externe Hyperosmolarität durch die intrazelluläre Akkumulation von Osmolyten, wie zum Beispiel Glycerin. Als Folge der Glycerin-Synthese wird ein Konzentrationsausgleich zwischen der extrazellulären Umgebung und den intrazellulären Bedingungen geschaffen. Die Aktivierung der Kaskade und damit der MAP-Kinase Hog1 ist essentiell für das Überleben der Hefezellen unter osmolaren Wachstumsbedingungen (Boguslawski & Polazzi, 1987; Brewster *et al.*, 1993). Die Signaltransduktion im HOG-MAPK-Weg verläuft über 5 Proteinkinasen (Abbildung 1.1). Es existieren drei MAPKKK, Ssk2, Ssk22 und Ste11, die über Phosphorylierung die MAPKK Pbs2 aktivieren, die ihrerseits dann die MAPK Hog1 phosphoryliert (Brewster *et al.*, 1993; Jansen 1998). Die Aktivierung der *HOG1*-vermittelten MAPK-Kaskade wird über zwei unabhängige Transmembransensoren eingeleitet, Sln1 und Sho1, welche die extrazelluläre Hyperosmolarität wahrnehmen (Maeda *et al.*, 1994, 1995; O'Rourke & Herskowitz, 2003).

Sln1 ist Teil eines Membran-assoziierten Komplexes, der mit dem prokaryontischen Zwei-Komponenten-System zu vergleichen ist (Posas *et al.*, 1998). Sln1 trägt drei Domänen: eine extrazelluläre Sensordomäne, eine C-terminale Histidin-Kinase- und eine Receiver-Domäne, die mit Ypd1 interagiert (Posas *et al.*, 1996). Die unphosphorylierte Form von Ssk1 aktiviert die MAPKKKs Ssk2 und Ssk22 durch Bindung an die N-terminalen inhibitorischen Domänen, was zu einer Induktion ihrer Autophosphorylierung führt (Posas & Saito, 1998).

Eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion wird durch Sho1 eingeleitet. Das Protein besteht aus vier Transmembransegmenten und einer C-terminalen cytoplasmatischen Region, die eine SH3-Domäne (SRC Homolog 3; Pawson & Gish, 1992) beinhaltet. Diese ist selektiv für Prolin-reiche Regionen und bindet an einem Prolin-reichen Motiv der N-terminalen Domäne von Pbs2. Diese Bindung ist notwendig für die Aktivierung von Pbs2 durch die MAPKKK Ste11, die mit Ste50 assoziiert ist.

Die Aktivierung von Pbs2 kann über zwei unabhängig voneinander funktionierende Wege reguliert werden (Maeda *et al.*, 1994; Maeda *et al.*, 1995; Posas & Saito, 1997): Zum Einen über das Zwei-Komponenten-System, eingeleitet durch das Membranprotein Sln1, zum Anderen über das zweite Membranprotein Sho1, dessen Bindung an Pbs2 die Aktivierung durch die MAPKKK Ste11 ermöglicht. Die Unabhängigkeit dieser beiden Wege in der HOG1-vermittelten Signaltransduktion ist durch epistatische Analysen bestätigt worden. Ein $\Delta sho1 \Delta ssk2 \Delta ssk22$ -Stamm kann hyperosmolare Wachstumsbedingungen nicht tolerieren, wobei Einfach- oder Doppeldeletionen in *SHO1* oder *SSK2/SSK22* einen osmoresistenten Phänotyp zeigen (Posas & Saito, 1997).

Die aktivierte MAPKK Pbs2 phosphoryliert die MAPK Hog1, die durch diese Aktivierung vom Cytoplasma in den Zellkern transportiert wird (Ferrigno *et al.*, 1998). Im Nukleus erfolgt die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren wie Msn2, Msn4, Hot1 und Msn1 (Schmitt & McEntree, 1996; Rep *et al.*, 1999). Die redundanten Zink-Finger-Proteine Msn2 und Msn4 binden an so genannte STRE-Sequenzen (stress responsive elements) in den Promotorregionen verschiedener Zielgene. So führt die Aktivierung von zwei dieser Zielgene, *GPD1* und *HOR2*, zur Expression der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase und der Glycerin-3-Phosphatase, zwei Enzymen der Glycerin-Synthese (Albertyn *et al.*, 1994). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Pbs2 nicht nur als MAPKK, sondern auch, so wie Ste5 im Pheromonantwortweg, als Gerüstprotein dient (Park *et al.*, 2003).

1.5 Gemeinsam verwendete Proteine

Die Abbildung 1.1 zeigt, dass die Proteine Cdc42, Ste20, Ste11 und Ste50 in gleicher Anordnung in den Signalwegen der Paarung, des invasiven Wachstums und im Signalweg für die Anpassung an hyperosmolare Stressbedingungen involviert sind.

In allen Signalwegen erfolgt die Interaktion von Ste50 mit Ste11 über die N-terminalen SAM (sterile alpha motif)-Domänen und ist essentiell (Ponting 1995; Xu *et al.* 1996; Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001). Zudem ist die Kinase-Aktivität von Ste11 für das Überleben der Zellen unter hyperosmolaren Bedingungen notwendig (Posas & Saito, 1997). Bei Untersuchungen mit den Deletionsstämmen *ste11sskk2ssk22* oder *ste50ssk2sskk22* konnte ein osmosensitiver Phänotyp gezeigt werden (O`Rourke & Herskowitz, 1998; Posas *et al.*, 1998).

Des Weiteren führt der Verlust der SAM-Domäne von Ste11 unter hyperosmolaren Bedingungen zu einem osmosensitiven Phänotyp und einer verminderten *FUS1*-Induktion im Pheromonantwortweg. Dieser Defekt in den beiden Signalwegen korreliert mit dem Phänotyp, der bei einer *STE50*-Deletion auftritt (Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001). Die MAPKKK Ste11 besitzt eine N-terminale regulatorische Domäne, die eine negative Wirkung

entfaltet; der Verlust dieser Domäne führt zu einer konstitutiv aktiven Kinase (Wang *et al.*, 1991; Cairns *et al.*, 1992; Posas & Saito, 1997). Eine Bindung dieser Domäne durch Ste50 führt wahrscheinlich zu einer Regulation der Ste11-Funktion, welche den Phänotyp vermittelt. Die Regulation von Ste11 durch Ste50 erfolgt in den Signalwegen für die Anpassung an hyperosmolare Stressbedingungen und im Pheromonantwortweg unterschiedlich (Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001). Ste11 Δ SAM oder eine STE50-Einfach-Deletion führen nicht zu einem totalen Verlust in der Signaltransduktion der Paarung, zeigen aber einen Defekt in der Anpassung an hyperosmolare Stressbedingungen (Wu *et al.*, 1999). Ein anderer Beweis für eine verschiedenartige Regulation ist die Tatsache, dass Δ ste50 durch eine Überexpression von STE11 im Pheromonantwortweg supprimiert werden kann, nicht aber in der HOG1-vermittelten Signaltransduktion (Ramezani-Rad *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999).

Die Funktion der Proteinkinase Ste20 kann in den gezeigten Signalwegen oberhalb des Ste50-Ste11-Komplexes eingeordnet werden. Die Kinase phosphoryliert die MAPKKK Ste11 und ist wie Ste50 essentiell für die Funktion von Ste11 (Wu *et al.*, 1995; Pryciak & Huntress, 1998; O'Rourke & Herskowitz, 1998; Ramezani Rad *et al.*, 1998). Ste20 ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die N-terminal eine Bindestelle für Cdc42 trägt (Leberer *et al.*, 1997).

Die Interaktion von Cdc42 und Ste20 ist in der Signaltransduktion nötig, da mit Hilfe von Cdc42 die Rekrutierung der Proteinkinase Ste20 an die Plasmamembran erfolgt (Leberer *et al.*, 1997; Raitt *et al.*, 2000). Im Anschluss an die Translokation an die Plasmamembran erfolgt die Aktivierung von Ste20, die über Phosphorylierung die untergeordneten Kaskade-Komponenten aktiviert. Cdc42 ist ein Haupt-Regulator für die Zellpolarität, der in vielen Wachstumsprozessen, in der Regulation des Zellzyklus, in der Aktinpolymerisierung und in der Signaltransduktion beteiligt ist. Cdc42 ist ein kleines G-Protein, das in GTP-gebundener aktiver Form und in GDP-gebundener inaktiver Form vorkommen kann, wobei die Umwandlung der GDP-gebundenen Form zur GTP-gebundenen Form durch Cdc24 (GDP/GTP-Austauschfaktor; GEF) katalysiert wird (Johnson 1999).

Die Interaktion zwischen Cdc42 und Ste20 konnte in den Signalwegen der Paarung, des filamentösen Wachstums und im Signalweg für die Anpassung an osmolare Stressbedingungen *in vivo* und *in vitro* bewiesen werden (Peter *et al.*, 1996; Leberer *et al.*, 1997; Johnson 1999; Raitt *et al.*, 2000).

Ein weiterer Interaktionspartner von Cdc42 in der Signaltransduktion ist Ste50. Über das 2-Hybrid-System konnte eine Interaktion von Ste50 mit Cdc42 *in vivo* und durch Pull-Down *in vitro* nachgewiesen werden (Sussmann, Hopp, Bühring und Ramezani Rad, nicht veröffentlichte Daten).

1.6 Die Funktion von Ste50 bei der Signaltransduktion

Ste50 weist essentielle Funktionen in den Signalwegen für die Induktion der Paarung, des invasiven Wachstums und der Pseudohyphenbildung sowie in der *HOG1*-vermittelten Signaltransduktion zur Anpassung an hyperosmolare Stressbedingungen auf.

Das Gen codiert für ein Protein, bestehend aus 346 Aminosäuren. Die Transkription von *STE50* erfolgt Zellzyklus-unspezifisch und ist unabhängig vom Paarungstyp. In den jeweiligen Signalwegen wird ein Rezeptor-G-Protein-Komplex über einen mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Komplex mit spezifischen Transkriptionsfaktoren verbunden. Die MAPKKK Ste11 gilt als Schlüsselenzym der verschiedenen MAP-Kinase-Kaskaden in *S. cerevisiae* und kann mit Ste50 in einem strukturellen und funktionellen Zusammenhang betrachtet werden.

Mit Hilfe von quantitativen Paarungsanalysen mit Deletionsmutanten konnte *STE50* innerhalb eines Genomprojektes identifiziert werden (Ramezani Rad *et al.*, 1991). Eine *STE50*-Einfachdeletion führt zur Reduzierung der Paarungseffizienz, resultierend aus einer kurzzeitigen Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus und einer schnellen Adaption gegenüber Paarungspheromonen (Ramezani Rad *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996). Die Überexpression von *STE50* hat eine erhöhte Sensitivität gegenüber α -Faktor zur Folge, resultierend in einer Steigerung der *FUS1*-Transkription in *MATa*-Zellen (Ramezani Rad *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1996). Ste50 kann in diesem Signalweg unterhalb der Pheromonrezeptoren auf dem Level des heterotrimeren G-Proteins oberhalb von *STE5*, *STE11* und *STE7* eingeordnet werden (Xu *et al.*, 1996). Im Signalweg für die Induktion der Paarung konnte über Two-Hybrid-Analysen die physikalische Interaktion von Ste50 mit Ste11 *in vivo* gezeigt werden, in der Ste50 die Rolle eines Regulators von Ste11 zugesprochen werden kann (Xu *et al.*, 1996).

Ferner stellt Ste50 im Signalweg für die Induktion des invasiven Wachstums und der Pseudohyphenbildung eine wichtige Komponente dar. Ein Δ *ste50*-Stamm hat die Fähigkeit für invasives Wachstum und zur Bildung von Pseudohyphen verloren. Dieser Defekt kann jedoch durch hyperaktives *STE11-1* supprimiert werden. Anhand von Komplementations-Untersuchungen kann Ste50 im Signaltransduktionsweg unterhalb des G-Proteins Ras2 auf der Ebene der MAPKKK Ste11 eingeordnet werden (Ramezani Rad *et al.*, 1998).

Eine weitere essentielle Funktion hat Ste50 im hyperosmolaren Stressantwortweg. Die Untersuchungen der Tripel-Deletionsmutanten Δ *ssk2* Δ *ssk22* Δ *ste50* bzw. Δ *ssk2* Δ *ssk22* Δ *ste11*, bei der beide sensorischen Signalwege ausgeschaltet sind, zeigten einen Funktionsverlust in der Anpassung an hyperosmolare Wachstumsbedingungen. Die Zellen waren unter hyperosmolaren Bedingungen nicht lebensfähig (Posas *et al.*, 1998). Auch in diesem Signalweg ist die Interaktion zwischen Ste50 und Ste11 essentiell für das Überleben der Zellen unter Osmo-Stress und für die Ste50-Funktion (Posas & Saito, 1998). Es konnte

gezeigt werden, dass die Interaktion hier ebenfalls konstitutiv vorliegt und nicht durch hyperosmolare Stressbedingungen induziert oder verändert wird (Posas *et al.*, 1998; Jansen 1998; Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001).

Durch eine Fragment-Analyse von Ste50 im 2-Hybrid-System konnte *in vivo* gezeigt werden, dass der minimal benötigte Bereich für die Interaktion mit Ste11 die Aminosäuresequenz 28-110 umfasst (Abbildung 1.2; Jansen *et al.*, 2001). Dieser Bereich deckt sich mit der von Ponting (1995) postulierten SAM-Domäne und ist notwendig für die Interaktion von Ste50 mit Ste11. Durch einen Protein-Bindungstest konnte die Protein-Protein-Interaktion über die N-terminalen SAM-Domänen *in vitro* nachgewiesen werden (Jansen 1998; Wu *et al.*, 1999; Jansen *et al.*, 2001).

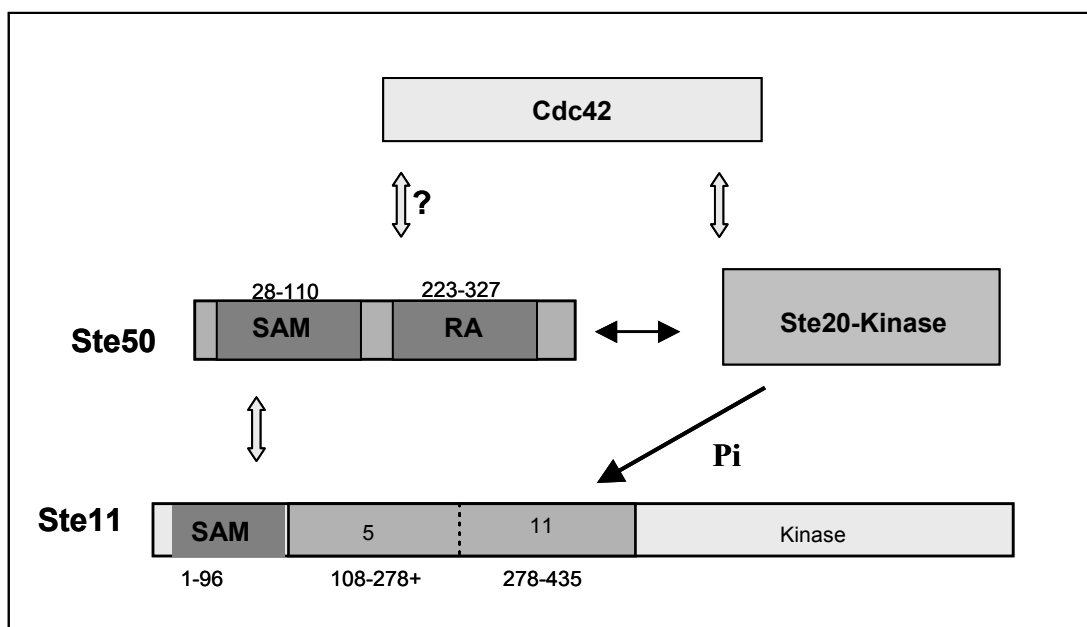


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Interaktionsverhältnisse von Ste50 mit Ste11, Cdc42 und Ste20.

Die Interaktion von Ste50 und Ste11 wird über die N-terminalen SAM-Domänen beider Proteine vermittelt. Das G-Protein Cdc42 interagiert mit der Proteinkinase Ste20, welche die MAPKKK Ste11 phosphoryliert und mit Ste50 interagiert. Ste20 und Ste50 zeigen eine genetische Interaktion (dünner Pfeil). Die Interaktion von Ste50 und Ste11 konnte *in vivo* sowie *in vitro* gezeigt werden, weitere Einzelheiten siehe Text.

Es konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass die Ste11-Ste50-Interaktion unabhängig von α -Faktor-induzierenden Bedingungen ist und auch in Abwesenheit von $G\alpha$, $G\beta$, Ste20 oder Ste5 stattfindet (Ramezani Rad *et al.*, 1998). Ste50 Δ SAM kann in einem *ste50*-Deletionsstamm die Funktion von Ste50 in der Signaltransduktion nicht komplementieren (Jansen 1998; Jansen *et al.*, 2001). Verschiedene Mutationen in der Ste50-SAM-Domäne zeigten eine abgeschwächte Interaktion mit Ste11 (Jansen *et al.*, 2001). Diese verhielten

sich unterschiedlich in den Signalwegen der Paarung, des invasiven Wachstums und im Signalweg zur Anpassung an hyperosmolare Stressbedingungen. Es zeigte sich eine gesteigerte Aktivität in der Signaltransduktion der Paarung und des filamentösen Wachstums. Gleichzeitig konnte ein reduziertes Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen beobachtet werden.

Anhand von Deletionsstudien am C-Terminus von Ste50 konnte nachgewiesen werden, dass diese Region eine essentielle Funktion in der Signaltransduktion erfüllt (Wu *et al.*, 1998). Eine RA-Domäne (RAS-associated domain; RAD) konnte über Sequenz- und Strukturvergleiche mit RalGDS (GDP/GTP-Austauschfaktor; GEF) im AS-Bereich 223-327 postuliert werden (Ponting & Benjamin, 1996). Man kann vermuten, dass Ste50 über diese Proteindomäne in einem funktionellen Zusammenhang mit Ras oder anderen kleinen G-Proteinen steht. Die genaue Funktion und Wirkungsweise von Ste50 in den verschiedenen Wegen ist jedoch weiter umstritten.

Proteine mit einer SAM-Domäne existieren in einer Vielzahl von eukaryotischen Organismen, wie zum Beispiel in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*; auch die humanen Proteine p63 und p73, Homologe des Tumorsuppressors p53, tragen dieses Protein-Motiv (Ponting 1995; Barr *et al.*, 1996; Thanos & Bowie, 1999).

SAM-Domänen besitzen die Fähigkeit, in Form von Homo- oder Heterodimeren zu assoziieren (Kyba & Brock, 1998; Thomas *et al.*, 1999). In der Sekundärstruktur weisen diese Motive eine Vielzahl von α -Helices auf, welche die Protein-Protein-Interaktionen erleichtern könnten (Ponting 1995). Es konnte eine leichte Homologie zwischen Ste50 und Ste11 mit Ste4 und Byr2 aus *Schizosaccharomyces pombe* ermittelt werden (Barr *et al.*, 1996). Die homologen Proteine weisen je eine SAM-Domäne auf und sind in der Signaltransduktion für die Pheromon-induzierte Paarung involviert. In *STE50*-SAM Mutanten konnte eine abgeschwächte Interaktion mit Ste11 im 2-Hybrid-System gezeigt werden (Jansen 1998; Jansen *et al.*, 2001). Innerhalb des SAM-Konsensus-Motivs wurden jedoch keine konservierten Aminosäuren ausgetauscht. Die aus dem Austausch einer Aminosäure resultierende Spezifitätsänderung deutet auf ein Vorkommen verschiedener SAM-Domänen hin, die spezifisch an die jeweilige Proteinfunktion angepasst sind und möglicherweise eine unterschiedliche Komplex-Oligomerisierung bewirken (Grimshaw *et al.*, 2003).

Des Weiteren besitzt Ste50 eine interne Serin-/Threonin-reiche (S/T)-Region, über die bisher nicht viel bekannt ist, sowie eine C-terminale RA-Domäne im Bereich der Aminosäuren 223-327. Bei allen Homologie-Vergleichen mit Ste50-ähnlichen Proteinen ist der Bereich zwischen der SAM- und der RA-Domäne am wenigsten konserviert. Dennoch werden hier sehr viele potentielle Phosphorylierungsstellen prognostiziert. Möglicherweise ist aber auch die stark saure Natur dieser Region für eine transaktivierende Aktivität bei der Transkription

verantwortlich. In Ste4 aus *S. pombe*, dem Protein mit größter Homologie zu Ste50, findet man in diesem mittleren Bereich eine Leucin-Zipper-Domäne für die Protein-Interaktion (Barr *et al.*, 1996). Bei Eya aus *Drosophila melanogaster* bewirkt ein Ras/MAPK-Signal die Phosphorylierung konservierter Stellen einer P/S/T-reichen Region und dadurch eine verstärkte Transkriptionsaktivität eines Eya/So-Komplexes (<http://www.drosophila-conf.org/genetics/gsa/dros/dros2003/abstract/f00074.htm>). Für Dinoflagellaten wurde gezeigt, dass eine S/T-reiche Region zwischen zwei hydrophoben Bereichen als Plastid-Transit-Sequenz dient (Nassoury *et al.*, 2003). In Mäusen wurde bei der Poly(A) Polymerase Papt die S/T-reiche Region als Regulationsdomäne auf Grund von Interaktion mit U1A vorgeschlagen (Lee *et al.*, 2000; Gunderson *et al.*, 1994, 1997).

Die RAD konnte anhand von Sequenz- und Sekundärstrukturvergleichen mit RalGDS postuliert werden (Ponting & Benjamin, 1996). RalGDS (GDP-/GTP-Austauschfaktor) fungiert als Effektor für Ras. Ras-Proteine sind GTPasen, die in der Signaltransduktion essentiell sind. Die Proteine wechseln zwischen einer GDP-gebundenen inaktiven Form und einer GTP-gebundenen aktiven Form. Die Proteine können an die so genannten RA-Domänen binden, die in einer Vielzahl von Proteinen als Struktur motive bekannt sind. Die dreidimensionale Kristallstruktur der RA-Domäne von RalGDS ist bekannt. Sie konnte durch Sequenzvergleiche als extrem divergent und variabel beschrieben werden (Ponting & Benjamin, 1996).

In *Schizosaccharomyces pombe* besitzt das Ste50-Homolog Ste4 eine RA-Domäne im Bereich der Aminosäuren 176-264 (Barr *et al.*, 1996; Ponting und Benjamin, 1996). Die Funktion der Domäne in *S. pombe* konnte aber bisher nicht definiert werden. *S. pombe* Ste4 trägt wie Ste50 in *S. cerevisiae* eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion für die Induktion der Paarung (Barr *et al.*, 1996). Anhand von Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Ste50-homologen Bereiche im C-Terminus von Ste4 jedoch nicht für die Interaktion mit Byr2 benötigt werden (Barr *et al.*, 1996).

Aufgrund der Variabilität, bezogen auf die Aminosäure-Sequenz der verschiedenen RA-Domänen (Abbildung 1.3), kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur Ras als Bindungspartner in Frage kommt (Ponting & Benjamin, 1996). Als potentielle Bindungspartner können des Weiteren andere kleine G-Proteine, wie Cdc42 oder Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins, in Frage kommen.

AF - 6	SGGTLRIYADSLK-PNIPYKTILLSTDPADFAVAEAELEKYGLEKENPKDYCIARVMLPP			
Ral - GDS	DCCIIIRVSLDVD--NGNMYKSILVTSQDKAPAVIRKAMDKHNLEEEEPEDYELLQILS--			
Ste50 (<i>S.c.</i>)	HPSAVSTANTPGPSPNEALKQLRASKEDSCERILKNAMKRHNLDQDWRQYVLVICY---			
Ste4 (<i>S.p.</i>)	GSFDLEVNDS----LTNAEKNRKLNVNLTYNELVLCMSLQRYRIDPNTWMSYDLLINY--			
Vorgesagte				
Sekundärstruktur	EEEEEEe	EEEEEEe	HHHHHHHHHHH	EEEEEEe
AF-6	GAQHSDEKGAKKEIILDDDECPLQIFREWPSDKGILVFQLKRRPP	(AS 245-347)		
Ral-GDS)	-----DDRKLKIPENANVFYAMNSTAN----YDFVLKKRTF	(AS 212-299)		
Ste50 (<i>S.c.</i>)	-----GDQERLLELNEKPVIIIFKNLQQLHPAIMLRRRGD	(AS 223-327)		
Ste4 (<i>S.p.</i>)	-----DDKEHAIPMDVKPLQLFRNLQKRGKSPSFVLSRRSC	(AS 176-264)		
vorhergesagte				
Sekundärstruktur	eee	eeee	eEEEEe	

Abbildung 1.3: Primär- und Sekundärstrukturvergleiche einiger RA-Domänen enthaltender Proteine mit Ste50.

Die RA-Domäne von Ste50 konnte über den Sequenz - und Sekundärstrukturvergleich mit RalGDS aus *Mus musculus* postuliert werden (nach Ponting & Benjamin, 1996). Bei AF-6 handelt es sich um ein menschliches Ras-Interaktionsprotein. Die, ausgehend von der bekannten RalGDS-Struktur (Huang *et al.*, 1998), für die anderen RA-Domänen zutreffend vorhergesagte Sekundärstruktur weist eine Vielzahl von β -Faltblattstrukturen auf, markiert mit dem Buchstaben E. Mit dem Buchstaben H wird die Sekundärstruktur einer α -Helix beschrieben.

1.7 Zielsetzung

Ste50 mit seinen Bindungsmöglichkeiten sowohl an G-Proteine als auch an Ste11, die Schlüssel-Proteinkinase der meisten Hefe-MAPK-Kaskaden, besitzt eine essentielle Funktion innerhalb der Signalwege für die Paarung, die Filamentation und die Osmotoleranz. Welche Voraussetzungen Ste50 für die Verbindung zwischen unterschiedlichen Rezeptor-bindenden G-Protein-Komplexen mit der MAPKKK Ste11 erfüllen muss, ist noch nicht geklärt worden. Ein großer Teil der Antwort darauf kann durch Untersuchungen zu Wechselwirkungen und Wirkmechanismen von Ste50 und interagierenden Molekülen innerhalb des Signalverarbeitungsnetzwerkes aus den verschiedenen MAP-Kinase-Kaskaden erreicht werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Phosphorylierungsstudien von Ste50 durchzuführen und die RA-Domäne sowie die Serin/Threonin-reiche mittlere Region von Ste50 näher zu charakterisieren.

Zur Charakterisierung der RA-Domäne sollten Fragmente von Ste50 auf ihre funktionelle Komplementation einer Ste50-Deletion untersucht werden. Auf dieser Basis sollte ein Mutagenese-Screen entwickelt werden, der funktionell defiziente RA-Mutationen aufzeigen kann. Die Funktion der Ste50-RA-Mutationen in den Signaltransduktionswegen für Paarung und Osmoresistenz sollte überprüft werden. Besonderes Augenmerk sollte auch auf die Auswirkungen der Mutationen in der RA-Domäne auf die Interaktion mit dem G-Protein Cdc42 und dessen Effektor Gic1gelegt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit waren dann vermutete Ste50-Modifikationen aufzuklären und insbesondere Hinweise auf eine Phosphorylierung von Ste50 zu überprüfen, u.a. durch massenspektroskopische Methoden nach Aufreinigung größerer Mengen an GST-Ste50.

Zur Aufklärung der biologischen Wirkung einer Phosphorylierung waren Mutanten notwendig, die, unfähig zu weiteren Phosphorylierungen, die Eingrenzung des Phosphorylierungs-Lokus ermöglichten. Die Auswirkungen einer solchen Mutante von Ste50 auf die Proteinstabilität und die Signaltransduktionswege für Paarung und Osmostressantwort waren zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den folgenden Herstellern bezogen: Acros Organics (New Jersey); Amersham International plc. (Buckinghamshire, England); Baker (Deventer, Niederlande); Biorad (Richmond, USA); Biozym (Hessische Oldendorf); Caesar & Lorentz GmbH (Hilden); Difco-Laboratories (Detroit, USA); Fluka AG (Basel, Schweiz); Gibco (Paisley, Schottland); Janssen (Beerse, Belgien); Merck (Darmstadt); Oxoid Ltd. (Basingstone/Hampshire, England); Pharmacia (Freiburg); Riedel-de Haen (Seelze); Roth (Karlsruhe); Serva (Heidelberg); Sigma (St. Louis, USA), bzw. nach Fusionen von den Nachfolgefirmer.

Die Restriktionsenzyme stammten von den Herstellern Roche/Boehringer (Mannheim), Gibco BRL (Paisley, Schottland) und New England Biolabs (Schwalmbach) und wurden mit den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Zymolyase T100 wurde von Seikagaku Corporation (Japan) bezogen.

2.2 Stämme

2.2.1 *Escherichia coli*

DH5 α F' F'end A1hsdR17_{r_k-m_k}+supE44thi-1recA1gyrA relA Δ (lacZYA-argF) U 169
(ϕ 80 Δ (lacZ)M15)(Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA)

XL1 Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'*proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10* (Tet^r)] (Stratagene, La Jolla, USA)

2.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*, Basisstämme

Die Uracil-Auxotrophie einiger Deletionsstämme wurde durch Gegenselektion auf 5-FOA wiederhergestellt, dies wird durch [FOA] angezeigt. Stämme der Laborsammlung sind mit LS bezeichnet (Quelle).

Stammname	Genotyp	Quelle/Referenz
W303-1A	<i>MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1 his3-11 ade2 can1-100</i>	Rothstein, Columbia University, New York

WAM4	W303-1A $\Delta ste50::ura3$ [FOA]	LS; HBH79
WAM4 $\Delta ssk1$	W303-1A $\Delta ste50 \Delta ssk1$	LS; HCH100
W303 $\Delta ste11$	W303-1A $\Delta ste11::ADE2$	LS; HBH80
WAM4 $\Delta ste11$	W303-1A $\Delta ste11::ADE2 \Delta ste50::HIS3$	LS; HBH81
HGX 132	MG5-A <i>sst2-1 MATa ura3 sst2-1 his3-11,15 his4-580 leu2 lys2 tyr1 trp1</i> ; supersensitiv gegen α -Faktor	LS; HGX132
PJ187	Two-Hybrid-Reporterstamm, <i>MATa/α, GAL_(UAS)LacZ₃, GAL_(UAS)ADE2, GAL_(UAS)HIS3</i> , (Laborsammlung, Kreuzung Y187 + PJ69 4A)	LS; PJ187

2.3 Medien

2.3.1 Medien *E. coli*

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Luria-Broth (LB):

- 1% Trypton
- 0,5 % Hefeextrakt
- 0,5 % Natriumchlorid

Selektion auf Ampicillin-Resistenz erfolgte bei einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml Medium.

2.3.2 Medien *S. cerevisiae*

Vollmedium (YPD):

- 1 % Hefeextrakt
- 2 % Pepton-Hydrolysat
- 2 % Glukose

Minimalmedium (SM):

- 0,17 % Yeast Nitrogen Base w/o aa
- 0,5 % Ammoniumsulfat
- 2 % Kohlenstoffquelle

Die Supplementierung erfolgte durch Zugabe folgender Komponenten: je Liter 20xLösung unter Aussparung der Zusätze, auf die selektioniert wurde: Arg 768 mg; Met 768 mg, Ile 1152 mg; Phe 960 mg; Val 1152 mg; Thr 1152 mg; Ino 1000 mg; Ura 40 mg; Trp 40 mg; Tyr 15 mg; Lys 60 mg; Ade 2,4 mg; Leu 60 mg; His 40 mg.

Sowohl für Hefe als auch *E. coli* wurde festen Nährböden 1,6 % Agar zugegeben.

2.4 Plasmide

2.4.1 Verwendete Plasmide

Die Plasmide der Laborsammlung sind mit LS gekennzeichnet und wurden, wenn nicht anders angegeben, von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe konstruiert. Ein kleines p nach einem Gen-Namen weist auf einen Promotor hin. Bei pGREG handelt es sich um Plasmide für die homologe Rekombination, eine *HIS3*-Kassette wird dabei gegen das Zielgen ausgetauscht (Jansen, persönliche Mitteilung).

Plasmidname	Merkmale			Quelle/Referenz
	Beschreibung	Marker	2 μ /CEN	
EB204	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i>	<i>URA3</i>	CEN	LS
pMS7	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -RA [*] -2	<i>URA3</i>	CEN	LS
pMS8	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -RA [*] -20	<i>URA3</i>	CEN	LS
pMS9	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -RA [*] -37	<i>URA3</i>	CEN	LS
pMS11	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -RA [*] -48	<i>URA3</i>	CEN	LS
pMS12	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -RA [*] -64	<i>URA3</i>	CEN	LS
EGX162	<i>FUS1</i> p- <i>lacZ</i> Reporter-Plasmid	<i>LEU2</i>	2 μ	LS
EFB269	pRS416 <i>STE50</i> pMYC- <i>STE50</i>	<i>URA3</i>	CEN	LS
P416GAL1	pRS416 GALp, <i>CYC1</i> -Terminator	<i>URA3</i>	CEN	Funk <i>et al.</i> , 1994
P415GAL1	pRS415 GALp, <i>CYC1</i> -Terminator	<i>LEU2</i>	CEN	Funk <i>et al.</i> , 1994
P414GAL1	pRS414 GALp, <i>CYC1</i> -Terminator	<i>TRP1</i>	CEN	Funk <i>et al.</i> , 1994
pGREG546	P416 GALp-GST	<i>URA3</i>	CEN	G. Jansen, BRI, Montreal
pGREG526	P416 GALp-13myc	<i>URA3</i>	CEN	G. Jansen, BRI, Montreal

Plasmide für das Two-Hybrid System; AD steht für die *GAL4*-Aktivierungsdomäne, BD für die *GAL4*-DNA-Bindedomäne.

Plasmidname	Merkmale			Quelle/Referenz
	Beschreibung	Marker	2 μ /CEN	
pAD2	<i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne (AD)	<i>LEU2</i>	2 μ	LS
pMBD	<i>GAL4</i> -DNA-Bindedomäne (BD)	<i>TRP1</i>	2 μ	LS
EFB67	<i>ADH1</i> p AD - <i>CDC42 Val12</i>	<i>LEU2</i>	2 μ	LS
EGX124	<i>ADH1</i> p BD- <i>STE50</i> (9-346)	<i>TRP1</i>	2 μ	LS, Xu <i>et al.</i> ,

				1996
EFB45	<i>METp BD-STE50-4</i>	<i>TRP1</i>	2 μ	LS
EFB95	<i>ADH1p AD-STE50-9</i>	<i>LEU2</i>	2 μ	LS
EGX393	<i>METp BD-STE50N (1-252)</i>	<i>TRP1</i>	2 μ	LS
EGX390	<i>METp BD-STE50C (202-346)</i>	<i>TRP1</i>	2 μ	LS

2.4.2 Für diese Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid-name	Merkmale			Konstruktion
	Beschreibung	Marker	CEN/ 2 μ	
pS1	pRS416-GALp-GST-CYC1Term.	URA3	CEN	Sal1 Verdau von EB204, Religation großes Fragment
pS6	pRS416-GALp-GST-STE50-RA (215-346)	URA3	CEN	Durch hom. Rekombination von RA-PCR-Produkt (EB204+ Oligo GST-RA-hin + RA-CYC1-her) mit pS1
pS10	pAD2-HIS3	<i>LEU2</i>	2 μ	HIS3-Kassette aus pGREG546 über EcoRI/XhoI in pAD2 kloniert; Two-Hybrid-Vorläufer für homologe Rek.; <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne
pS11	pMBD-HIS3	<i>TRP1</i>	2 μ	HIS3-Kassette aus pGREG546 über EcoRI/XhoI in pMBD kloniert; Two-Hybrid-Vorläufer für homologe Rek.; <i>GAL4</i> -DNA-Binde-Domäne
pS12	AD- <i>GIC1</i>	<i>LEU2</i>	2 μ	Durch hom. Rekombination von <i>Gic1</i> PCR-Produkt (chr.DNA + Oligo <i>Gic1</i> -hin und <i>Gic1</i> -her) mit pS10 entstanden
pS13	BD- <i>GIC1</i>	<i>TRP1</i>	2 μ	Durch homologe Rekombination von <i>Gic1</i> PCR-Produkt (chr.DNA + Oligo <i>Gic1</i> -hin und <i>Gic1</i> -her) mit pS11 entstanden
pS14	<i>GAL1p</i> -13Myc- <i>GIC1</i>	URA3	CEN	Durch homologe Rekombination von <i>Gic1</i> PCR-Produkt (chr.DNA + Oligo <i>Gic1</i> -hin und <i>Gic1</i> -her) mit pGreg526 entstanden
pS15	<i>GAL1p</i> -13Myc-STE50-RA	URA3	CEN	Durch homologe Rekombination von RA-PCR-Produkt (EB204 + Oligo SAM-RA-Greg hin und SAM-RA-Greg her) mit pGreg526 entstanden
pS16	AD-STE50-RA	<i>LEU2</i>	2 μ	Durch homologe Rekombination von RA-PCR-Produkt (EB204 + Oligo SAM-RA-Greg hin und SAM-RA-Greg her) mit pS10 entstanden
pS17	BD-STE50-RA *2	<i>TRP1</i>	2 μ	Durch hom. Rek. von pMS7-PCR-Produkt (pMS7 + Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS11 entstanden
pS18	BD-STE50-RA*20	<i>TRP1</i>	2 μ	Durch hom. Rekombination von pMS8-PCR-Produkt (pMS8

				+Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS11 entstanden
pS19	BD-STE50-RA*37	TRP1	2μ	Durch hom. Rekombination von pMS9-PCR-Produkt (pMS9 +Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS11 entstanden
pS20	BD-STE50-RA*48	TRP1	2μ	Durch homologe Rekombination von pMS11-PCR-Produkt (pMS11+Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS11 entstanden
pS21	BD-STE50-RA*64	TRP1	2μ	Durch homologe Rekombination von pMS12-PCR-Produkt (pMS12 +Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS11 entstanden
pS22	AD-STE50-RA*2	LEU2	2μ	Durch homologe Rekombination von pMS7-PCR-Produkt (pMS7 + Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS10 entstanden
pS23	AD-STE50-RA*20	LEU2	2μ	Durch homologe Rekombination von pMS7-PCR-Produkt (pMS7 + Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS10 entstanden
pS24	AD-STE50-RA*37	LEU2	2μ	Durch homologe Rekombination von pMS7-PCR-Produkt (pMS7 + Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS10 entstanden
pS25	AD-STE50-RA*48	LEU2	2μ	Durch hom. Rekombination von pMS11-PCR-Produkt (pMS11 + Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS10 entstanden
pS26	AD-STE50-RA*64	LEU2	2μ	Durch homologe Rekombination von pMS12-PCR-Produkt (pMS12 + Oligo Ste50-rec-hin und SAM-RA-Greg her) mit pS10 entstanden
pS27	STE50p-GST- STE50-RA*2	URA3	CEN	Klonierung des STE50-Promotors aus EFB269 in pMS7-12, jeweils <i>SpeI/SacI</i> -Verdau
pS28	STE50p-GST- STE50-RA*20			
pS29	STE50p-GST- STE50-RA*37			
pS30	STE50p-GST- STE50-RA*48			
pS31	STE50p-GST- STE50-RA*64			
pS32	STE50p-7Myc-STE50-RA*2	URA3	CEN	Klonierung der STE50-Mutationen aus pMS7-12 in EFB269, jeweils <i>Clal/XhoI</i> -Verdau
pS33	STE50p-7Myc-STE50-RA*20			
pS34	STE50p-7Myc-STE50-RA*37			
pS35	STE50p-7Myc-STE50-RA*48			
pS36	STE50p-7Myc-STE50-RA*64			
pS37	pRS416-GALp-GST-STE50-S102A	URA3	CEN	AS-Austausch Serin 102 nach Alanin, s.2.4.3
pS38	pRS416-GALp-GST-STE50-S127A	URA3	CEN	AS-Austausch Serin 127 nach Alanin, s.2.4.3
pS39	pRS416-GALp-GST-STE50-S202A	URA3	CEN	AS-Austausch Serin 202 nach Alanin, s.2.4.3
pS40	pRS416-GALp-	URA3	CEN	AS-Austausch Serin 202 nach

	GST- <i>STE50</i> -S202E			Glutamat, s.2.4.3
pS41	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -3A	<i>URA3</i>	CEN	AS-Austausch Serin 196,198,202 nach Alanin, s.2.4.3
pS42	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -S211A	<i>URA3</i>	CEN	AS-Austausch Serin 211 nach Alanin, s.2.4.3
pS43	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> -S259A	<i>URA3</i>	CEN	AS-Austausch Serin 259 nach Alanin, s.2.4.3
pS44	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i>	<i>URA3</i>	CEN	Umklonierung des <i>STE50</i> -Promotors aus EFB269 in EB204 über <i>SpeI/SacI</i>
pS45	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i> -S102A	<i>URA3</i>	CEN	Umklonierung des <i>STE50</i> -Promotors aus EFB269 in pS37 bis pS43 über <i>SpeI/SacI</i>
pS46	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i> -S127A			
pS47	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i> -S202A			
pS48	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i> -S202E			
pS49	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i> -3A			
pS50	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i> -S211A			
pS51	p416- <i>STE50</i> p-GST- <i>STE50</i> -S259A			

2.4.3 AS-Austausche durch gezielte PCR-Mutagenese und PCR-Assembly

Potentielle Phosphorylierungsstellen von Ste50 wurden durch Sequenzanalyse ermittelt (siehe Ergebnisse). Oligonucleotide mit der gewünschten Mutation / dem gewünschten Austausch führten durch PCR-Assembly zu den Plasmiden pS37-pS43.

Das Schema wird hier einmal beispielhaft für den Austausch S102A angeführt, für die anderen Plasmide sind nur der Austausch und die Austausch-Oligonucleotide zu ändern. Alle PCR-Produkte und geschnittenen DNA-Stücke wurden mit dem QiaexII-Kit nach Herstellerangaben aus Agarose-Gelen aufgereinigt.

1. PCR mit den Oligonucleotiden S102A-hin und RA-CYC1-her => Produkt A
2. PCR mit den Oligonucleotiden S102A-her und Seq-RA (Annealing im GST) => Produkt B
3. PCR mit den Oligonucleotiden Seq-RA und RA-CYC1-her und den Produkten A und B als Template => Endprodukt C mit dem gewünschten Austausch

Template für 1 und 2 ist EB204 (pRS416-GALp-GST-*STE50*-CYC1T).

Das Endprodukt C wird dann durch homologe Rekombination in *S.cerevisiae* in den *Clal/HindIII*-linearisierten Vektor pS1 kloniert, das resultierende Plasmid wird durch Sequenzierung des *STE50*-Anteils bestätigt.

pS37	S102A	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> ; AS-Austausch Serin 102 nach Alanin
pS38	S127A	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> ; AS-Austausch Serin 127 nach Alanin
pS39	S202A	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> ; AS-Austausch Serin 202 nach Alanin
pS40	S202E	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> ; Austausch Serin 202 nach Glutamat
pS41	3A	pRS416-GALp-GST- <i>STE50</i> ; Serin 196, 198, 202 nach Alanin

pS42 S211A pRS416-GALp-GST-STE50; AS-Austausch Serin 211 nach Alanin
 pS43 S259A pRS416-GALp-GST-STE50; AS-Austausch Serin 259 nach Alanin

2.5 PCR (Polymerase Chain Reaktion)

In einem Personal Cycler (Biometra, Göttingen) wurden PCR-Reaktionen mit dem PCR-Long-Expand-Kit oder mit dem PCR-High-Fidelity-Kit der Firma Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben in 50µl-Ansätzen durchgeführt. Eine Aufreinigung der Produkte erfolgte entweder mit dem PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben oder klassisch durch Phenol-Chloroform-Extraktion aus Low Melting Agarose-Gelen (Maniatis *et al.*, 1982). Für einige Reaktionen wurden die Oligonukleotide zuvor über Polyacrylamid-Gele aufgereinigt (Maniatis *et al.*, 1982).

2.5.1 Verwendete Oligonucleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
GST-RA-hin	CCAAAATCGGATCTGATCGAAGGTCGTGGGATCC CCGGGAATTCGT C AAAATCTTTGCACAAGGATAG C	Homologe Rek. RA hinter GST
RA-CYC1-her	GGCGTGAATGTAAGCGTGACATAACTAATT A CATG ACTCGAGTTAGAGTCTTCCACCGGGGG	Homologe Rek. RA hinter GST (ohne <i>Sall</i> Schnittstelle)
SAM-RA-Fusion hin	CTGATCAATAAGATGAGAGACAGCAAGTTGGAGT GGAAGGACGACAAGT C AAAATCTTTGCACAAGGA TAGC	Homologe Rek. Interne Deletion
SAM-RA-Greg hin	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC <u>AAT GT</u> CAAAATCTTTGCACAAGGATAGC	Homologe Rek. RAD
SAM-RA-Greg her	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG ACTTAGAGTCTTCCACCGGGGG	Homologe Rek. RAD
Seq-RA(GST)	GGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGG	Sequenzierung (Annealing in GST)
Seq ste50-mut	GTGTGACGGTGATTTGAATAAGGCC	Sequenzierung (Annealing in Ste50)
Seq 200	CCTTCTTCAAACAACAC	Sequenzierung (Annealing in Ste50)
Seq 259	CCAATCTCACCCATCTGCCG	Sequenzierung (Annealing in Ste50)
Gic1 hin	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC	Homologe Rek. <i>GIC1</i>

	GAC <u>AAT</u> <u>G</u> ACTGAAGGAAAGAGGCTGCAAC	
Gic1 her	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG AC TCAGGTATTTTCGAGGAGTACTAGTTTC	Homologe Rek. <i>GIC1</i>
Gic2 hin	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC <u>AAT</u> <u>G</u> ACTAGTGCAAGTATTACCAATAC	Homologe Rek. <i>GIC2</i>
Gic2 her	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG AC TTAAGTTTGCAGGGGCTCGAGC	Homologe Rek. <i>GIC2</i>
Sal1-Cyc her	GGCGTGAATGTAAGCGTGAC	Klonierung/ Sequenzierung
RA-215 hin	CCCACTCAAATCTTTGCACAAGGATAGC	Umklonierung RAD- Mutanten Volllänge, PCR-Assembly
RA-215 her	GCTATCCTTGTGCAAAGATTTTGAGTGGG	Umklonierung RAD- Mutanten Volllänge, PCR-Assembly
P50Myc hin	CTAGTATGGTTCACGGGGG	Umklonierung RAD- Mutanten Volllänge mit 7Myc
Cdc42- Greg hin	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC <u>AAT</u> <u>G</u> CAAACGCTAAAGTGTGTTGTTG	Homologe Rek. <i>CDC42</i> und <i>CDC42</i> <i>Val12</i>
Cdc42- Greg her	GCG TGA CAT AAC TAA TTA CAT GAC TCG AGG TCG AC CTACAAAATTGCACATTTTT	Homologe Rek. <i>CDC42</i> und <i>CDC42</i> <i>Val12</i>
Ste50-rec- hin	GAA TTC GAT ATC AAG CTT ATC GAT ACC GTC GAC <u>AAT</u> <u>G</u> GAGGACGGTAAACAGGCCATCAATG	Homologe Rek. STE50, Rec-her = SAM-RA-Greg her
pAD2-RA hin	CCAAAAAAGAGATCGAATTGCGGAATTCGATATC AAGCTTATCG TCAAATCTTTGCACAAGGATAGC	Klonierung RA (215ff) in 2Hybrid-Vektor
S102A hin	CAATAAGATGAGAGAC <u>GCC</u> AAGTTGGAGTGGAAG G	Mutagenese S102A
S102A her	CCTTCCACTCCAACCTT <u>GG</u> CGTCTCTCATCTTATTG	Mutagenese S102A
S127A hin	GTACTACTACAG <u>GCT</u> GCGAAATTGCAAG	Mutagenese S127A => <i>Pvull</i> entstanden
S127A her	CTTGCAATTTTCGCA <u>AGCT</u> GTAGTAGTGTAC	Mutagenese S127A
S202A hin	CCGTCAAGGAGAGA <u>AGCC</u> CGGTAACGGTATTTA GG	Mutagenese S202A

S202A her	CCTAAATACCGTTACCGGG GGC TTCTCTCCTTGAC GG	Mutagenese S202A
S202E hin	CCGTCAAGGAGAGA AGAG CCGGTAACGGTATTTA GG	Mutagenese S202E
S202E her	CCTAAATACCGTTACCGG CTC TTCTCTCCTTGACG G	Mutagenese S202E
S211A hin	GGTATTTAGGCAACCC GCT CTTTCCCACTCAAAT C	Mutagenese S211A
S211A her	GATTTTGAGTGGGAA AGAG CGGGTTGCCTAAATA CC	Mutagenese S211A
S259A hin	CAGTTGCGTGCA GCT AAAGAAGACTCC	Mutagenese S259A
S259A her	GGAGTCTTCTTT AGCT GCACGCAACTG	Mutagenese S259A
3A hin	G TTCATAACCGACA AGCAC CG GCA AGGAGAGA AG CCCCGGTAACGG	Mutagenese S196A, S198A, S202A
3A her	CCGTTACCGGGGCTTCTCTCCTTGCCGGTGCTTG TCGGTTATGAAC	Mutagenese S196A, S198A, S202A

2.6 Zufällige PCR-Mutagenese

Um die Fehlerhäufigkeit zu erhöhen, wurde Taq-Polymerase verwendet. In 4 verschiedenen Ansätzen wurde die Konzentration je eines Nukleotids von 10 mM im Ansatz auf 1 mM erniedrigt, zugleich wurde jedem Ansatz 10 mM des Basenanalogs Inositoltriphosphat (ITP) zugegeben. Bei Einbau von ITP kommt es später an dieser Stelle zu einem zufälligen Basenaustausch.

2.7 Transformation

2.7.1 Transformation in *S. cerevisiae*

Die Transformation erfolgte nach der Gefrier-Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1991).

Herstellung von kompetenten Zellen

Die Hefezellen wurden in YEPD oder SD-Medium bis zu einer optischen Dichte OD_{600nm} von 0,5-0,8 angezogen, abzentrifugiert und anschließend mit Lösung A gewaschen. 50 ml Kultur wurden in je 1,5 ml 50 % Glycerin resuspendiert und in 0,2 ml Aliquots bei $-70^{\circ}C$ gelagert.

Transformation der kompetenten Zellen

Es wurden 0,5-2µg DNA, 5 Heringssperm-DNA (2 mg / ml) in ein Volumen von 25µl zu den kompetenten Zellen gegeben, und anschließend wurde der Transformationsansatz unter Schütteln bei 37°C für 5 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml Lösung B, mehrmaliges Invertieren und eine Inkubation für 1h bei 30°C. Danach wurden die Zellen 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, mit 1 ml Lösung C gewaschen und auf Selektivmedium ausplattiert.

Lösung A: 1M Sorbitol, 10 mM Bicin, 3 % Ethylenglykol, pH 8,35

Lösung B: 40 % PEG 1000, 200 mM Bicin, pH 8,35

Lösung C: 150mM NaCl, 10mM Bicin, pH 8,35

Transformation von Hefe nach der Lithiumacetat-Methode

Die Transformation von Hefe wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt. Es wurden 10 ml einer Kultur mit OD_{600nm} von 0,6 bis 1 abzentrifugiert, die Zellen einmal in H₂O gewaschen, in 600µl 0,1 M LiAc resuspendiert und für 15 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 0,48 ml 50% PEG, 72 µl 1M LiAc, 1 µg Plasmid-DNA, 50 µl denaturierter Heringssperm-DNA (2 mg / ml) und 90 µl deionisiertes Wasser zugegeben und erneut für 30 min bei 30°C inkubiert. Danach folgte ein Hitzeschock über 30 min bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, in 1 ml sterilem deionisiertem Wasser resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

2.7.2 Transformation in *E. coli*

Elektroporation:

400 ml LB-Medium wurden 1:100 mit einer Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-1 kultiviert. Die Kultur wurde dann für 15-30 min auf Eis inkubiert und anschließend in Falcon-Röhrchen für 15 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit H₂O (erst 1 Vol., dann ½ Vol.) und einmal mit 1/50 Vol. 10% Glycerin gewaschen (alle Schritte auf Eis bzw. 4°C). Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 1,5 ml 10% Glycerin resuspendiert und in 40 µl-Aliquots aufgeteilt, welche dann bei -70°C gelagert wurden.

40 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 µl eines gefällten oder 1 µl eines 1:10 verdünnten Ligationsansatzes versetzt und in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Spaltbreite gegeben. Die Elektroporation erfolgt mit dem Gene-Pulser™/Pulse Controller (Biorad, München) [1,6 kV; 25 µF; 200 Ohm]. Die Zellen wurden dann mit 1 ml LB-Medium versetzt und für ca. 30 - 45 min bei 37°C auf dem Schüttler erholt. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (13000 rpm, 2 Min), in 200 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB/Amp-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht.

RbCl₂-Methode:

Die Transformation von RbCl₂-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (1983). Pro Transformation wurden 20-500 ng DNA mit 200 µl auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis, 45 Sekunden Hitzeschock (42°C) und erneuter zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 30-45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden sie auf LB/Amp-Platten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.8 Präparation von Nukleinsäuren

2.8.1 Minipräparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* in kleinen Mengen erfolgt nach der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode durch die alkalische Lyse. Dazu wurden 1,5 ml einer 2 ml Über-Nacht-Kultur bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 100 µl Puffer 2 (200 mM NaOH; 1% SDS) und mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Zur Neutralisierung wurden die Ansätze dann mit 100 µl Puffer 3 (2,50 mM KOAc, pH 4,8) versetzt und für 15 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die DNA durch Zugabe von 2 Vol. 96%igem Ethanol gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation pelletiert, mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und in 20 µl H₂O aufgenommen.

2.8.2 Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli*

Gereinigte DNA in größeren Maßstäben wurde mit dem Qiagen Midi Plasmid/Cosmid Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben isoliert.

2.8.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Hefezellen aus 10 ml Übernachtskultur wurden geerntet, mit deionisiertem Wasser gewaschen, und das Pellet wurde anschließend in 1 ml P1 (50 mM Tris / HCL, pH 8,0) mit RNase resuspendiert und nach Zugabe von 1 ml P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) gemischt. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Zugabe von 2/3 Volumen Glasperlen unter Schütteln bei 4°C. Der Überstand wurde mit 0,5 ml P3 (3 M KOAc, pH 5,5) versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl deionisiertem Wasser aufgenommen, und die DNA wurde im Anschluss für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten (elektroph.)

DNA-Fragmente wurden in 0,8-1,5%igen Ethidiumbromid-haltigen (50 ng/ml) Agarosegelen bei 80-150 V/cm aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (50x TAE-Puffer: 242 g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; ad 1 l mit H₂O bideist) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Proben wurden für den Gellauf mit $\frac{1}{10}$ Vol. 10-fach konzentriertem Ficoll-SDS-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kB DNA-Leiter der Firma Gibco BRL.

2.10 Reinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung eines „QIAEX II-Gel-Extraction-Kit“ von der Firma Quiagen. Das gewünschte DNA -Fragment wurde aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten, gewogen und mit 3 Volumen QX1-Puffer versetzt. Für DNA-Fragmente $\leq 2\mu\text{g}$ wurde die zu isolierende DNA mit 10 μl Glasmilchsuspension versetzt und bei 50°C für 10 min inkubiert. Der entstandene Glasmilch / DNA-Komplex wurde 1 mal mit QX1-Puffer und zweimal mit Puffer PE gewaschen, das Pellet wurde getrocknet, und anschließend wurde die DNA mit 20 μl deionisiertem Wasser eluiert.

2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration hochmolekularer DNA wurde durch Vergleich mit einem DNA-Mengenstandard (1 kB DNA-Leiter, GibcoBRL) in einem Agarosegel abgeschätzt. Bei Oligonukleotiden oder zur Sequenzierung wurde die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen (Maniatis *et al.*, 1982). Dabei entspricht eine Extinktion $A_{260\text{nm}} = 1$ etwa 50 μg doppelsträngiger DNA pro ml. Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ gibt die Reinheit der DNA an.

2.12 Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse

Die zu sequenzierende DNA wurde an die Firma Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) mit den entsprechenden Oligonukleotiden gesendet. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe der Computerprogramme Chromas 2.0, ClustelX, Genedoc (Multiple Sequence Aligment Editor & Shading Utility Version 2.6.001) manuell editiert, mit anderen Sequenzen verglichen und abschließend grafisch dargestellt.

2.13 Herstellung von Proteinrohextrakten

5 OD_{600nm} Zellen von logarithmisch wachsenden Kulturen werden abzentrifugiert (5 min 3.000 x g) und mit Wasser sowie Aufschlusspuffer (25mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM EDTA;

0,1% TritonX-100; 10% Glycerin; 150 mM NaCl; 1 mM DTT) gewaschen. Das Zellpellet wird in 150 µl Aufschlusspuffer mit Protease-Inhibitoren (Aprotinin 1µg/ml, Leupeptin 5µg/ml, Pepstatin 1µg/ml, Antipain 5µg/ml, Sojabohnen-Trypsininhibitor 100µg/ml, 1 mM PMSF) resuspendiert und mit 100µl Glasperlen (Jansen Ø0,45 cm, gereinigt mit HCl und Wasser) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgt für 6 x 30 Sekunden auf einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) bei 4°C und maximaler Intensität. Nach Aufschluss werden wieder 150 µl Aufschlusspuffer mit Protease-Inhibitoren zugegeben und die Flüssigkeit mit der Pipette abgenommen. Nach Zentrifugation (10 min bei 13.000 rpm; Heraeus Biofuge Pico) wird der Proteinrohextrakt in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und verwendet.

2.14 Herstellung von affinitätsgereinigtem Ste50 für SDS-PAGE

Zunächst wird wie in 2.13 verfahren. Anschließend wird der Rohextrakt mit 50 µl 50%iger nach Herstellerangaben vorbereiteter Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) 2 Stunden bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert. Die Sepharose wird dreimal 10 min mit Aufschlusspuffer mit Zusätzen gewaschen sowie 1-3 mal mit Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0). Die Elution von GST-Ste50 erfolgt entweder unspezifisch mit 2xSDS-Probenpuffer (4% SDS; 50 mM Tris/HCl pH 6,8; 20% Glycerin, 20 mM DTT, Bromphenolblau) oder mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 20-50 mM frisch reduziertem Glutathion). Eluiertes Protein wird mit gleichem Volumen 2xSDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert und aufgetragen.

2.15 Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität

2.15.1 Quantitative Bestimmung mit ONPG

Für ONPG-Messungen (2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid) wurden 5 ml Kulturen bei einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,8 bis 1,0 geerntet, mit 1 ml Z - Puffer (0,1 M Natrium-Phosphat, pH 7,0; 20 mM KCl; 1 mM $MgSO_4$) gewaschen, anschließend in 300 µl Z-Puffer resuspendiert und mit Glasperlen (Volumen 100 µl, Ø 0,45mm) durch zehninütige Inkubation in einem Vibrax-Schüttler (Firma Janke & Kunkel) aufgeschlossen. Der Überstand wurde 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Sigma, 101M), das Pellet verworfen. Der Rohextrakt wurde direkt für Aktivitätsmessungen und Proteinbestimmungen eingesetzt. Die gesamte Bearbeitung erfolgte bei 4°C.

1 ml ONPG-Lösung (4mg/ml Z-Puffer) wurde mit verschiedenen Mengen Rohextrakt (1-10 µl) versetzt. Über einen Zeitraum von bis zu 2 h wurden die Proben bei 37°C inkubiert und nach schwacher Gelbfärbung mit 0,5 ml 1M Na_2CO_3 - Lösung abgestoppt. Die

photometrische Bestimmung der Extinktion bei OD_{490nm} erfolgte in Plastik-Küvetten, die Zeit bis zum Abstoppen wurde notiert.

Die Berechnung der spez. Aktivitäten erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{spez. Aktivität} = \frac{\Delta A_{420nm} \cdot V}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}} \quad (\text{munits/mg})$$

ΔA_{420nm} : Extinktionsänderung im Verlauf von einer Minute bei 420 nm

ε : Extinktionskoeffizient für ONPG (0,0045/mM·cm)

d: Schichtdicke (1cm)

V: Gesamtvolumen

v: Probenvolumen

2.15.2 Semiquantitative Bestimmung (X-Gal-Overlay)

Die halbquantitative Messung der β -Galaktosidase-Aktivität von Hefe-Stämmen wurde mittels eines X-Gal-Überschichtungstests auf einer mit Hefestämmen gewachsenen Agarplatte (nach Suckow & Hollenberg, 1998) durchgeführt. Die Stärke der erzielten Blaufärbung diente als Maß für die β -Galaktosidase-Aktivität. Dazu wurden pro Überschichtung 50 mg Agarose in 5 ml H_2O aufgekocht und mit 5 ml 1M Natriumphosphat-Puffer (pH 7,0) versetzt. Nach kurzer Inkubation in einem $70^\circ C$ Wasserbad wurden 100 μl einer 20%igen SDS-Lösung sowie 200 μl X-Gal-Lösung (10 mg 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid/ml Dimethylformamid) hinzugegeben. Die Platten wurden nun vorsichtig mit dieser Lösung überschichtet und bis zum Erstarren der Agarose ruhig bei RT stehen gelassen. Die enzymatische Reaktion fand bei $30^\circ C$ statt und war in der Regel nach 24 h abgeschlossen.

2.16 Proteinbestimmung nach Bradford

790 μl Wasser wurden mit 10 μl Rohextrakt (Verdünnung 1:10) und 200 μl Bradford-Reagenz (Biorad) vermischt, 10 min bei RT inkubiert und die Absorption anschließend bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer (Beckmann DU 7400) gemessen. Die Proteinmenge im Rohextrakt wurde anschließend anhand einer BSA-Eichreihe mit definierten Proteinkonzentrationen (0 bis 12 μg BSA in 2 μg -Schritten) aus den Absorptionswerten berechnet. Auch hier erfolgte eine Dreifachbestimmung.

2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli (1970) verwendet, durchgeführt mit einem 3%igen Sammelgel (Sammelgelpuffer: 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS) und einem 7,5-15%igen Trenngel (Trenngelpuffer: 375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS). Das Trenngel wurde vor dem Auspolymerisieren mit n-Butanol oder Isopropanol überschichtet, um die Reaktion mit Luftsauerstoff zu vermeiden. Als Molekulargewichtsmarker wurde der "HMW-Prestained"-Marker (Sigma) und die BenchMark-Prestained Protein Ladder (Invitrogen) verwendet. Der Gellauf erfolgte in einer Hoefer-Kammer 12-16 h über Nacht bei 40-50 V bzw. vier Stunden über Tag bei 100-200 V oder in einer BioRad Minigelkammer 1 h über Tag bei 100-200 V mit Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS).

2.18 Detektion von Proteinen im SDS-Gel

2.18.1 Silberfärbung

Eine häufig eingesetzte Methode zur Untersuchung des Reinheitsgrades von aufgetrennten Proteinen ist die Silberfärbung (Nesterenko *et al.*, 1994; Blum *et al.*, 1987). Diese Methode beruht auf der Komplexbildung der Ag^+ -Ionen mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine und deren Reduktion zu metallischem Silber in Anwesenheit von alkalischem Formaldehyd. Mit Hilfe dieser Methode können Proteine in Nanogramm-Mengen nachgewiesen werden (5-30 ng/Proteinbande).

Dazu werden die Proteine nach dem Gellauf zunächst für mindestens zwei Stunden im Gel fixiert (Fixierlösung: 50% Methanol, 12% Essigsäure, Formaldehyd 0,5 ml/l), das Gel 3 x 20 min in 50% Ethanol, danach 1 min in Natriumthiosulfatlösung (0,2 g/l) gewaschen und für 20 min in eine Silbernitratlösung in Anwesenheit eines starken Reduktionsmittels (Silbernitrat 2g/l; Formaldehyd 0,75 ml/l) eingelegt. Das Gel wurde danach 3 x 2 min mit Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in einer Natriumcarbonatlösung (Na_2CO_3 60 g/l; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,8mg/l; Formaldehyd 0,5 ml/l). Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stopplösung (50% Methanol; 12% Essigsäure) beendet. Das Gel konnte dann auf Whatman-Papier getrocknet werden.

2.18.2 Coomassie-Färbung

Die Inkubation des SDS-Gels in Färbelösung (7,5% Essigsäure; 50% Methanol; 0,1% Coomassie Brilliant Blue R) erfolgt bis zur gewünschten Farbsättigung, teilweise bei erhöhter Temperatur (1h 75°C). Mit Entfärber (7,5% Essigsäure, 20% Methanol) wird der Hintergrund reduziert bis die Banden im gewünschten Maße deutlich sind.

2.18.3 Phosphoprotein-Anfärbung im Gel

Der "ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain" Kit der Firma Molecular Probes (Nr. P-33300) zur Anfärbung von phosphorylierten Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde laut Herstellerangaben verwendet. Das Gel wurde zunächst 1x über Nacht mit 200 ml Fixierlösung inkubiert (50% Methanol, 10% Trichlor-Essigsäure), am nächsten Morgen nochmal für 1 h zur Entfernung letzter SDS-Reste. Anschließend wurde es insgesamt 4 x 15 min mit je 200ml Wasser gewaschen. Die eigentliche Färbung erfolgte mit 200 ml „ProQ Diamond phosphoprotein gel stain“ über einen Zeitraum von 3 ½ Stunden im Dunkeln. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde 3x1 Stunde sowie ein letztes Mal über Nacht mit je 200 ml Wasser im Dunkeln gewaschen.

Zur Detektion wurde ein Laserbasierendes Fluoreszenz und Radioisotop Imaging System (Fujifilm FLA-3000) im Sample Mode mit den Einstellungen Fluoreszenzanregung bei 532 nm, Filter 580 nm mit Sensitivität F10, F100, F1000 verwendet. Die mit dem Image Reader V1.8E entstehende *.img-Datei wurde mit dem Image Gauge V3.0 (beide mitgeliefert) in ein TIFF-Format umgewandelt.

2.19 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Immunoblots)

Nach erfolgter Protein-Auftrennung (SDS-PAGE) werden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P von Millipore, Porengröße 0,45µm) transferiert. Die Übertragung erfolgt in Blot-Puffer (25 mM Tris; 0,192 M Glyzin; 20% Methanol) für 1 ½ bis 3 Stunden bei 40 V (250 mA) im Kühlraum. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wird der Filter ein bis zwei Stunden oder über Nacht in PBSTB inkubiert (10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,3% Tween 20; 5% BSA). Die Reaktion mit dem Primärantikörper (1:1.000 in PBSTB) erfolgt für 1-14 Stunden bei RT. Nach dreimaligem Waschen á 10 min mit PBST (PBSTB ohne BSA) erfolgt die Inkubation mit sekundärem Antikörper (1:5.000 oder 1:50.000) für ein bis zwei Stunden. Auf die folgenden drei Waschschritte mit PBST folgt die Detektion des sekundären Antikörpers.

2.19.1 Immuno-Detektion durch alkalische Phosphatase

Für den Nachweis von mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem sekundären Antikörper wird die Membran zunächst 2 min in Substratpuffer (0,1 M Tris/HCl pH 9,5; 0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂) äquilibriert. Anschließend erfolgt die Farbreaktion nach Zugabe von 50 ml Substratpuffer mit 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT.

2.19.2 Immuno-Detektion mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper (LumiLight)

Zur Detektion von Peroxidase-gekoppeltem Antikörper mit dem Lumi Light Chemiluminescent Substrate (Amersham Pharmacia) wurde ein Chemilumineszenz Image

Analyser (Fujifilm LAS-1000) in Kombination mit dem Image Reader LAS-1000 V1 verwendet. Die Einstellungen waren: Image, Dark-Frame-Subtraction (File), Exposure; Linse: URF 20L, Iris 1,4.

2.20 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
@GST	Polyklonal aus Kaninchen gegen Glutathion-S-Transferase (GST), 1:5.000	Santa Cruz
@myc	Polyklonal aus Maus gegen Myc 1:1.000	Calbiochem
@Kaninchen	Polyklonal aus Maus gegen Kaninchen IgG (H+L), gekoppelt mit alk. Phosphatase, 1:50.000	Dianova
@Maus	Polyklonal aus Kaninchen gegen Maus IgG (H+L), gekoppelt mit Peroxidase, 1:50.000	Dianova
@Phosphoserin	Monoklonal, Anti-Phosphoserin Klon PSR-45, aus Maus. Verdünnung 1:50	Sigma, P3430

2.21 Aufreinigung von GST-Ste50 im Liter-Maßstab

Für Massenspektroskopie, Phosphoprotein-Staining im Gel und die Phosphoserin-Detektion wurde die folgende Aufreinigungsstrategie verwendet:

Der Stamm HGX132 (*sst2-1*, supersensitiv gegen α -Faktor) wurde mit dem Plasmid EB204 (Gal1-Promotor, GST-Ste50) transformiert und in YNB ura^- 1% Galaktose 3% Raffinose als Übernachtvorkultur (5ml) angezogen. Daraus wurde eine 200 ml Vorkultur angeimpft, welche wiederum zum Animpfen der Hauptkultur (4-6 x 1l Fernbach-Kolben) diente. Diese wurde bei OD 0,8-1,0 mit α -Faktor induziert (da supersensitiv, nur mit 0,1 μ M statt 5 μ M Endkonzentration).

Die Zellen wurden zu den gewünschten Zeitpunkten auf Eis abgestoppt und abzentrifugiert und anschließend erst mit destilliertem Wasser, dann mit Aufschlusspuffer ohne Protease-Inhibitoren (PI) gewaschen (JA-10-Zentrifugen (Beckmann) bei 5.000 x g für 15 min). Das Volumen wurde je Liter Medium auf 8-10 Aliquots á 10 ml eingengt (12 ml Greiner-Röhrchen), das Zellpellet nach dem Waschen eingefroren. Je Zellpellet wurden 1,2 ml Aufschlusspuffer mit PI und 1,6 ml Glasperlen (Durchmesser 4,5 mm) zugegeben. Der Aufschluss erfolgte im Kühlraum mit einem IKA-Vibrax VXR (Janke und Kunkel) bei maximaler Intensität in 6 Schritten á 45 Sekunden mit Zwischenkühlung auf Eis. Dieser Rohextrakt wurde gesammelt, die Glasperlen je mit 800 μ l Puffer +PI nachgespült und ebenfalls gesammelt.

Die Entfernung schwerer Zellreste erfolgte in JA-20-Gefäßen (Beckmann) durch 15 min 20.000 x g und anschließend 20 min 28.000 x g. Die Affinitätsreinigung erfolgte mit 3 ml

Glutathion-Sepharose 4B von Amersham Biosciences in einer Säule mit 1,5 cm Durchmesser. Nach Äquilibrierung der Säule mit Aufschlusspuffer ohne PI (ca. 100 ml) wurde der gesammelte klare Rohextrakt mit einer Durchflussrate von 0,8 ml/min auf die Säule gegeben. Das Waschen erfolgte zunächst mit 10ml Aufschlusspuffer +PI je Liter Medium, anschließend noch einmal 20 ml je Liter ohne Protease-Inhibitoren. Die Elution des gebundenen GST-Ste50 erfolgte mit 15 ml Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 30 mM Glutathion), anschließend wurde es mit Amicon Ultra (Millipore, Ausschlussgröße 30 kDa) von 15 ml auf 100-300 μ l aufkonzentriert und je nach Bedarf noch einmal mit normalen Centricon-Konzentratoren der gleichen Molekulargewichts-Trenngröße auf 20-50 μ l eingeengt.

Aufschlusspuffer: 50mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,1% TritonX-100; 10% Glycerin; 150 mM NaCl; 1mM DTT.

Protease-Inhibitoren: Aprotinin 1 μ g/ml, Leupeptin 5 μ g/ml, Pepstatin 1 μ g/ml, Antipain 5 μ g/ml, Sojabohnen Trypsininhibitor 100 μ g/ml, 1 mM PMSF.

2.22 Protein-Dephosphorylierung mit CIP

Aus je vier OD_{600nm} Zellen (OD_{600nm} 0,6-0,8) werden Rohextrakte hergestellt und GST-Ste50 mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt und mit 2xSDS-Probenpuffer eluiert (siehe 2.14). Anschließend wird mit 60 mM Tris/HCl pH 6,8 auf eine SDS-Konzentration von 1% verdünnt. Die Dephosphorylierung durch 4-5 Units Calf Intestine Phosphatase (CIP) findet bei 37°C für 4 h statt. Die Proben werden aufs Gel aufgetragen.

2.23 Massenspektroskopie

Die massenspektroskopische Analyse erfolgte durch die Firma Protagen (Dortmund). Ausgangsmaterial war aufgereinigtes (2.21), α -Faktor-induziertes GST-Ste50 im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel. Es wurden 3 Spots aus der Hauptbande und ein Spot in der schwachen Bande darüber für die Analyse ausgewählt (siehe Ergebnisse, Abbildung 3.12). Zunächst wurde ein tryptischer Verdau durchgeführt und ein Peptidmassenfingerabdruck erstellt. Einige Peaks wurden dann durch MS/MS weitergehend untersucht (zur Ermittlung der Aminosäure-Sequenz), um einerseits mögliche Modifikationen zu lokalisieren und andererseits die Zuordnung durch Peptidmassenfingerabdruck zu verifizieren. Um andere Teile des Moleküls zugänglich zu machen, wurde auch ein Verdau mit unterschiedlichen Konzentrationen an Chymotrypsin durchgeführt.

2.24 Induktion des Paarungspheromonantwortweges mit α -Faktor

Zellen werden bei OD_{600nm} 0,6-0,8 mit 5 μ M Endkonzentration α -Faktor induziert, für den *sst2-1* Stamm (HGX132) wurde 0,1 μ M Endkonzentration verwendet. Ausserdem wird zur pH-Wert-Einstellung 20 mM Natriumzitat zugegeben, da dies die Sensitivität erhöht. Falls nichts

anderes angegeben ist, erfolgte eine Probennahme nach 90 min Induktion (Maximum der Antwort, Jansen *et al.*, 2001)

2.25 Sensitivitätstest gegenüber Hyperosmolarität

Der Nachweis der Osmostressantwort erfolgte nach Saito und Posas (1997). Logarithmisch wachsende Zellen werden auf Minimalmedium mit und ohne Natriumchlorid verschiedener Konzentrationen getropft (Verdünnungsreihe: 1,5 μ l OD_{600nm} 0,4 (links), um je einen Verdünnungsfaktor von 10 nach rechts abnehmend), das Wachstum nach 3-5 Tagen Inkubation bei 30°C wird protokolliert.

2.26 Immunpräzipitation

4 OD_{600nm} logarithmische Zellen werden in 100 μ l TN (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl, Protease-Inhibitoren (siehe 2.13)) resuspendiert und für 3 min im Vibrax mit Glasperlen aufgeschlossen. Anschließend werden die Proben 4 min mit 1% (w/v) SDS Endkonzentration gekocht und mit 4 Volumen Verdünnungspuffer abgekühlt (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM Na-EDTA pH 7,5; 1% TritonX-100, 150 mM NaCl; Protease-Inhibitoren). Nach Abtrennung von Trümmern wird 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 40 μ l 50% Protein A-Sepharose versetzt, es folgt eine 15 minütige Inkubation bei 4°C auf dem Kippschüttler. Daraufhin wird dem Überstand 7,5 μ l Antikörper zugegeben und 1 ½ bis 2 Stunden bei 4°C auf einem Kippschüttler inkubiert, anschließend sehr kurz abzentrifugiert und der Überstand erneut mit 40 μ l 50% Protein A Sepharose über Nacht auf einem Kippschüttler inkubiert (4°C). Nach 2 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wird das Pellet 4x mit Waschpuffer 1 (150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 0,5% TritonX-100; 0,05% DOC; 0,01% SDS; 1mM PMSF; 1 μ g/ml Aprotinin; je 1 ml, 5-10 Min) und 1x mit 500 μ l Waschpuffer 2 (150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7,4); 5mM EDTA; 1mM PMSF; 1 μ g/ml Aprotinin) gereinigt, der Überstand mit 40 μ l SDS-Probenpuffer versetzt und nach 5 min bei 95°C auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.27 Two-Hybrid-Interaktionsnachweis

Das Two-Hybrid-System ist eine molekulargenetische Methode, um Protein-Protein-Interaktionen mittels eines Reportergens nachweisen zu können (Fields & Song, 1989; Phizicky & Fields, 1995). Man nutzt hier die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren einen modularen Aufbau haben. Viele Transkriptionsfaktoren haben eine sequenzspezifische DNA-Bindedomäne, die an den Promotor bestimmter Gene bindet. Zudem haben sie, insofern es sich um Aktivator-Proteine handelt, eine Aktivierungsdomäne, die mit dem Pol-II-Komplex in Wechselwirkung tritt. Diese beiden Strukturmerkmale müssen nicht kovalent miteinander

verknüpft sein, sondern können durch Interaktion zweier beliebiger Proteine in räumliche Nähe gebracht werden (Phizicky & Fields, 1995). Man fusioniert einen der Interaktionspartner an eine DNA-Bindedomäne und den anderen an eine Aktivierungsdomäne. Durch Expression dieser Fusionsproteine in einem Stamm mit *GAL*-Promotorsequenzen vor Reporter genen kann die Wechselwirkung dieser beiden Proteine zur Transkriptionsaktivierung eines gut messbaren Reporter gens (z.B. *lacZ*) führen. Die Menge des gebildeten Reporter gen-Produkts kann als direktes Maß für die Stärke der Interaktion verwendet werden. In diesem Fall wurden die Domänen von Gal4 verwendet. Bei dem Stamm handelt es sich um PJ187, eine Kreuzung aus PJ-69-4A (James *et al.*, 1996) und Y187 (Durfee *et al.*, 1993) des Genotyps *MATa/α*, *GAL_(UAS)LacZ₃*, *GAL_(UAS)ADE2*, *GAL_(UAS)HIS3* sowie einer Deletion der relevanten *GAL*-Gene. In diesem Stamm kann neben der β -Galaktosidase-Aktivität auch das Wachstum auf Minimalmedium ohne Histidin oder Adenin als Maß für die Interaktionsstärke dienen. Histidin zeigt allerdings einen relativ hohen Hintergrund, es werden viele falsch-positive Interaktionen durch Wachstum angezeigt, dafür werden auch schwache Interaktionen wahrgenommen. Die Adenin-Mutation hat stärkere Auswirkungen, hier können die Zellen nur wachsen, wenn die Interaktion sehr stark ausgeprägt ist. Ein Nachteil der Methode ist die Tatsache, dass die Proteine im Kern interagieren müssen, was bei normalerweise membranständigen Proteinen zu Problemen führt.

3 Ergebnisse

A) Charakterisierung der Ste50-RA-Domäne

Wie bereits in der Einleitung geschildert, ist in drei MAPK-Wegen der Hefe *S. cerevisiae* (Paarung, Osmostress (HOG) und filamentöses Wachstum) eine essentielle Beteiligung von Ste50 an der Signaltransduktion vom G-Protein zur MAPKK-Kinase Ste11 gezeigt worden. Die genaue molekulare Funktion hingegen steht immer noch aus.

Die beiden Protein-Interaktionsdomänen von Ste50 (SAM und RA) sind aufgrund von Sequenzhomologien definiert und beschrieben worden (Ponting & Benjamin, 1995; Ponting 1996). Während die SAM-Domäne für die notwendige Interaktion mit Ste11 sorgt und dadurch die Aktivierung nachfolgender MAPKK durch Phosphorylierung ermöglicht, konnte für die Ras-Assoziierungs-Domäne von Ste50 noch keine Funktion beschrieben werden.

Um die Funktion der RA-Domäne aufzuklären, wurden zwei Strategien verfolgt:

1. zufällige Mutagenese der RA-Domäne und Etablierung eines Screening-Verfahrens mit anschließender Charakterisierung der Mutanten;
2. Identifizierung von Interaktionspartnern der Ste50-RA-Domäne.

3.1 Etablierung eines Funktionalitätstests für die RAD

Die RA-Domäne von Ste50 wurde weiträumig durch PCR in einen *CEN*-Vektor mit *GAL1*-Promotor kloniert (AS 215-346), die Expression (Galaktose-Induktion) im Western-Blot überprüft (Abb. 3.1).

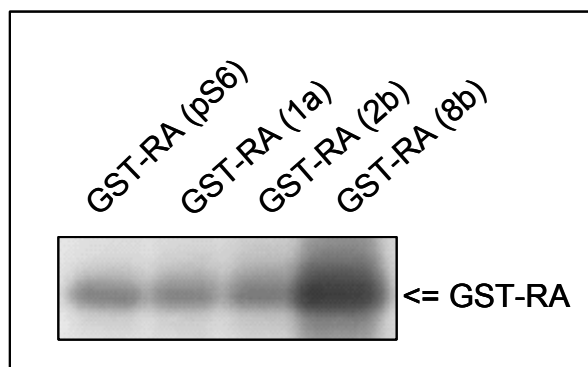


Abbildung 3.1 Expression verschiedener Ste50-RA-Klone

Dieser Immunoblot zeigt die Expression verschiedener GST-RA-Klone im W303-1A-Stamm nach Aufreinigung mit Glutathion-Sepharose. Der Antikörper richtet sich gegen das GST-Epitop, das Fusionsprotein hat eine Größe von 41,7 kDa. Für die weiteren Experimente wurde der Klon pS6 verwendet

Da für die RAD alleine noch kein Funktionalitätsassay zur Verfügung stand, musste einer entwickelt werden. Die methodisch einfachste Überprüfung der Ste50-Funktion erfolgt durch die Beobachtung der Osmotoleranz. Hierbei wird das Wachstum eines W303-1A $\Delta ste50\Delta ssk1$ -Stammes mit dem zu testenden Protein auf/in Medien verschiedener Osmolarität beobachtet. Findet Wachstum trotz der Gegenwart von NaCl statt, wird die Funktion von Ste50 im HOG-Signalweg (siehe Einleitung) komplementiert.

Wir hatten früher schon Hinweise auf eine teilweise Komplementierung der Ste50-Funktion bei der Paarung durch gleichzeitige Expression von dessen N- und C-terminalen Fragmenten (Bühning und Ramezani-Rad, unveröffentlichte Daten). Dies wurde auch für den HOG-Signalweg überprüft. Bei Ko-Expression des N-Terminus (AS 1-227) und der RA-Domäne (AS 215-346) von Ste50 auf zwei getrennten Plasmiden in einem W303-1A $\Delta ste50\Delta ssk1$ -Stamm konnte das normalerweise gehemmte Wachstum auf hochosmolarem Medium partiell wiederhergestellt werden (Abbildung 3.2). In der Abbildung wird die Auswirkung der gleichzeitigen Expression des N- und C-Terminus von Ste50 (504, RA) in einem W303-1A $\Delta ste50\Delta ssk1$ -Stamm auf SG-Medien verschiedener Osmolarität gezeigt. Der Stamm ohne Ste50-Domänen („Leerplasmide“) dient als Negativkontrolle. Er kann auf festem Medium ohne Salzzugabe gut wachsen (Abbildung 3.2, A untere Reihe). Auf festem Medium mit 0,4 M NaCl und 0,7 M NaCl ist kein Wachstum mehr möglich. Wird nur der N-Terminus (504) oder nur der C-Terminus (RA) von Ste50 exprimiert, ist ebenfalls kein Wachstum auf Medium mit Salz zu beobachten. In der ersten Reihe ist die Positivkontrolle dargestellt, WT-Ste50 wird in ganzer Länge exprimiert und komplementiert den Deletionsdefekt, die Zellen sind hier in der Lage auch auf Medium mit Salz zu wachsen. In der zweiten Reihe sieht man, dass die gleichzeitige Expression von N- und C-Terminus von Ste50 den Wachstumsdefekt nahezu ebensogut komplementiert wie die Expression des Gesamt-Ste50.

Betrachtet man hingegen das Wachstum in flüssigem SG-Medium (Abb. 3.2, B), so erhält man anstelle von Alles-oder-Nichts-Effekten graduierte Unterschiede. In Medium ohne Salz zeigt sich bereits ein vermindertes Wachstum für die Stämme ohne funktionelles Ste50, also die Negativkontrolle mit Plasmiden ohne Ste50-Bestandteile, sowie die Stämme mit nur dem N- oder nur dem C-Terminus. Der WT-Stamm (W303-1A) sowie die Doppeldelionsstämme mit WT-STE50 auf Plasmid oder mit beiden Domänen auf getrennten Plasmiden wachsen hingegen gleich gut. Bei einer Konzentration von 0,4 M NaCl im Medium beobachtet man bereits einen Nachteil für die Plasmid-kodierten Proteine im Vergleich zum WT-Stamm W303-1A ohne Deletion. Bei 0,7 M NaCl wird jetzt auch ein schlechteres Wachstum für den Stamm mit gleichzeitiger Expression des N- und C-Terminus im Vergleich zum Plasmid-kodierten Ste50 deutlich. Hier ist nicht gezeigt, dass der WT-Stamm auch noch bei 1 M

NaCl-Konzentration langsam wachsen kann, der Stamm mit beiden Domänen hingegen nicht (siehe Diskussion).

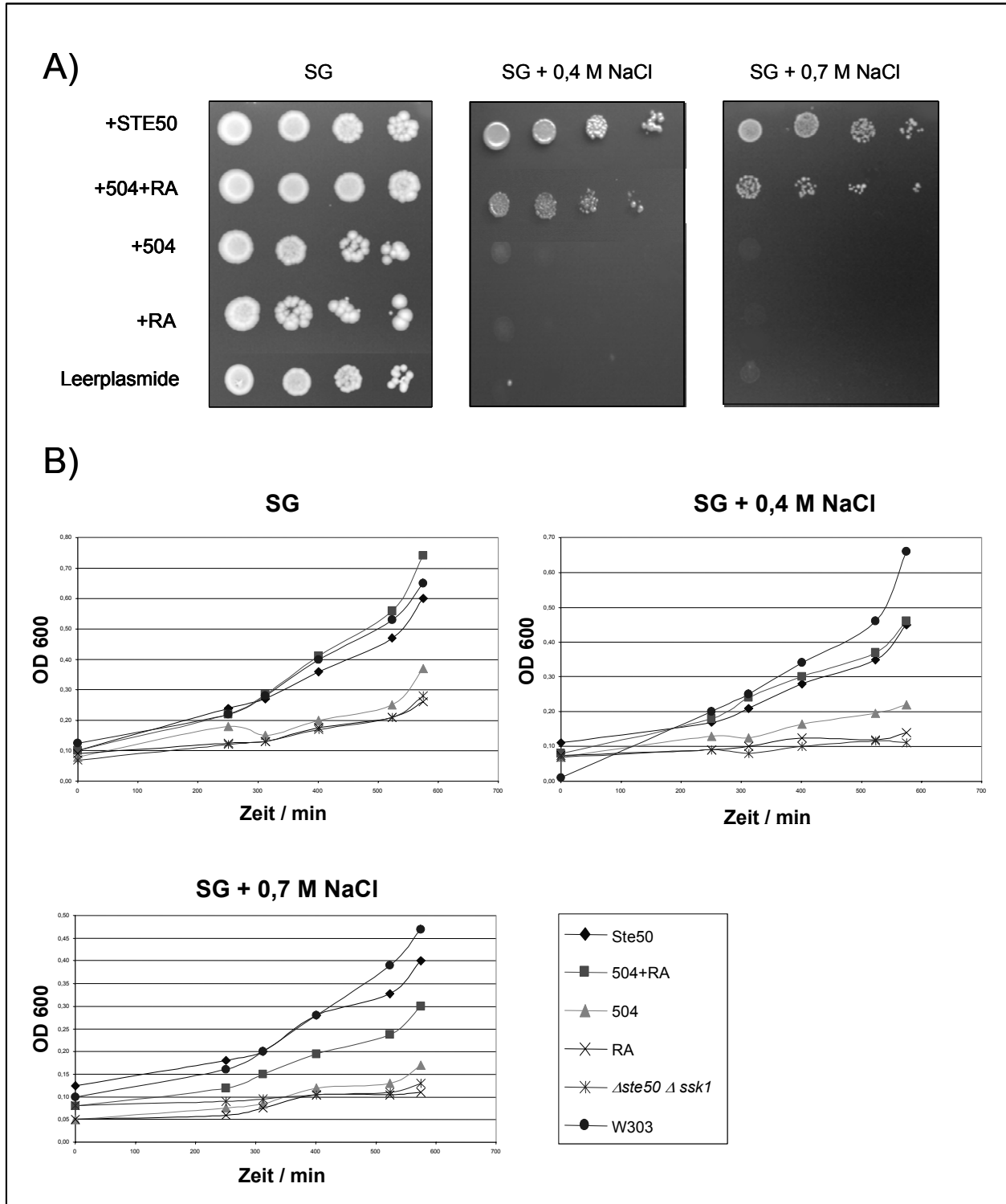


Abb. 3.2 Das Wachstumsverhalten eines $\Delta ste50 \Delta ssk1$ -Stammes mit verschiedenen Plasmiden: 504 = Ste50 AS 1-252, EGX393; RA = Ste50 AS 215-346, pS6; Leerplasmide sind die Negativkontrolle ohne Ste50-Domänen p414GAL1 p416GAL1.

Der transformierte Doppeldeletionsstamm W303-1A $\Delta ste50 \Delta ssk1$ (HCH100) wurde auf festem (A) und in flüssigem SG-Medium (B) unter Bedingungen keiner, mittlerer (+0,4 M NaCl) und hoher (+0,7 M NaCl) Osmolarität beobachtet. Gezeigt ist eine Verdünnungsreihe von 0,4 OD_{600nm}, um jeweils einen Faktor 10 absteigend von links nach rechts. SG steht für synthetisches Minimal-Medium mit 2% Galaktose. Nähere Einzelheiten siehe Text.

Auch wurde in Vorversuchen ein schwaches Wachstum des Doppeldeletionsstammes bei Expression nur der beiden endständigen Domänen ohne den Mittelteil (SAM: 1-110; RA: 215-346) in flüssigem Medium mit 0,4 M NaCl beobachtet, jedoch nicht auf festem Medium (Daten nicht gezeigt). Für die Etablierung des Testsystems genügte dies allerdings nicht, da zur Auswahl von Mutanten mit Phänotypen Wachstum auf festem Medium notwendig war. Daher wurden für die weiteren Analysen und die Mutagenese das N-terminale Plasmid (AS 1-252, EGX393) und das Plasmid mit der RA-Domäne (AS 215-346, pS6) ausgewählt.

3.2 Mutagenese der RAD

Der Funktionalitäts-Assay diente als Basis eines Screening-Verfahrens zur Generierung von RA-Mutanten, durchgeführt von Melanie Sussman (Diplomarbeit). Ziel war es, Mutationen ausfindig zu machen, die in der RAD-vermittelten Interaktion mit G-Proteinen defekt sind. Durch PCR wurde die RAD zufällig mutagenisiert (mittels Einbau des Basenanalogs ITP; 2.6) und in W303-1A $\Delta ste50\Delta ssk1$ -Zellen transformiert, welche bereits das N-terminale Plasmid enthielten. Anschließend wurde das Wachstum auf festem Medium mit verschiedenen Salzkonzentrationen (0, 0,4; 0,7 M NaCl) beobachtet. Mutierte Phänotypen wurden durch Wiederholung bestätigt, die mutagenisierten RA-Plasmide isoliert, auf Expression überprüft und retransformiert sowie anschließend sequenziert. Um die Auswirkungen auf die Ste50-Funktion unabhängig von dem Phänomen der Trans-Komplementation zu beobachten, wurde die mutierte RA-Domäne in WT-Ste50 umklont, wieder auf Expression überprüft und sequenziert. Auf diese Weise wurden fünf Mutanten isoliert, die kein Wachstum auf Salz mehr zuließen (Abb. 3.3). Drei dieser Mutanten (2, 20, 64) haben volle Länge, bei zweien ist ein etwas verfrühtes Stop-Kodon am C-Terminus vorhanden.

In Abbildung 3.3 ist das Endergebnis der Wachstumstests von RA-Mutanten auf SG-Medium mit Salz zu sehen. Die fünf gezeigten Mutanten können auf Medium ohne Salz wachsen, auf Medium mit hoher Osmolarität hingegen nicht. Nur Ste50-RA-20 zeigt unverdünnt noch etwas Wachstum bei 0,7 M NaCl. Die Positivkontrolle ist derselbe Stamm mit WT-Ste50-Plasmid, der bei allen Bedingungen gut wächst, die Negativkontrolle enthält nur Leerplasmid. Die Expression der STE50-RA-Mutanten ist in Abbildung 3.4 gezeigt. Für Ste50-RA-37 und Ste50-RA-48 sieht man ein verkürztes Expressionsprodukt. Bei der Sequenzierung ist hier auch jeweils ein verfrühtes Stop-Kodon nachgewiesen worden. In Tabelle 3.1 sind die Mutationen auf DNA-Ebene und die daraus folgenden AS-Austausche ausgewiesen; stille Mutationen wurden nicht angegeben. Die Sequenzierung zeigte, dass die Mutationen alle im gewünschten RA-Bereich liegen.

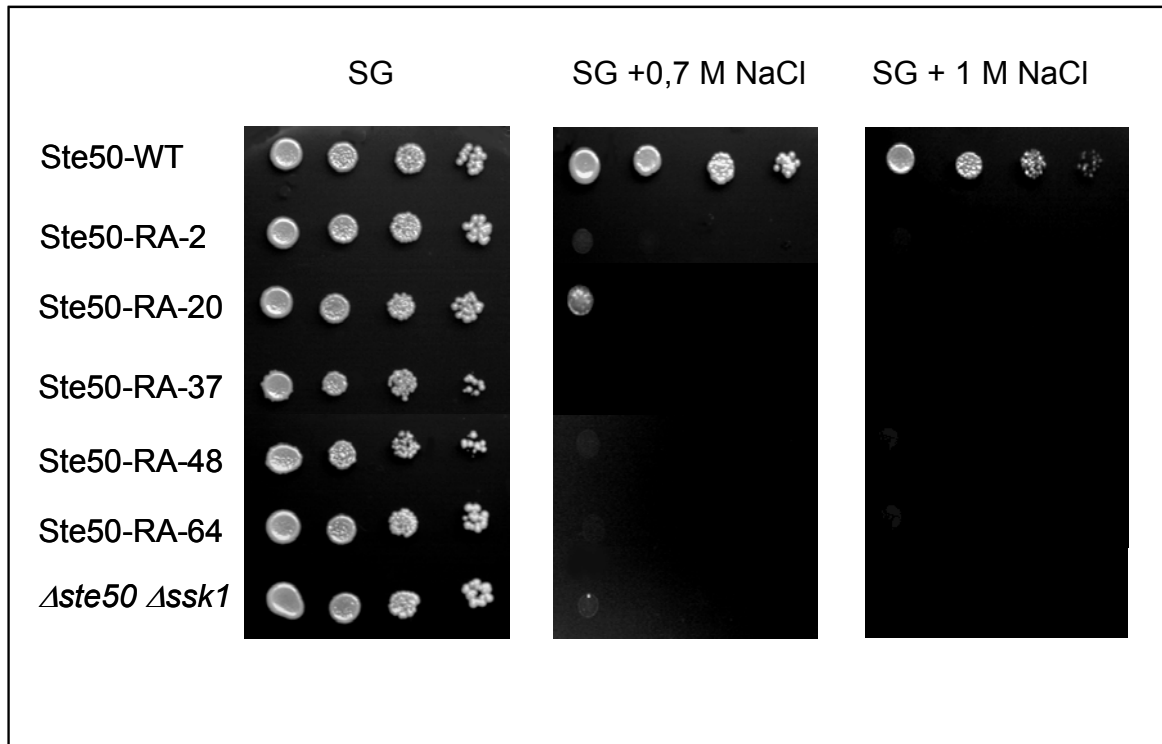


Abbildung 3.3 Erhöhte Osmosensitivität von RA-Mutanten gegenüber NaCl

Gezeigt ist das Wachstum von Doppeldeletionsstämmen W303-1A $\Delta ste50 \Delta ssk1$ (HCH100) nach 3 Tagen (SG & 0,7 M) sowie 5 Tagen (1 M) bei 30°C, welche die angegebenen Ste50-Varianten (pEB204, pMS7, 8, 9, 11, 12) exprimieren. Es handelt sich um Verdünnungsreihen, welche, von OD_{600nm} 0,4 ausgehend, jeweils um einen Faktor 10 von links nach rechts verlaufen. SG = Synthetisches Minimalmedium mit 2% Galaktose.

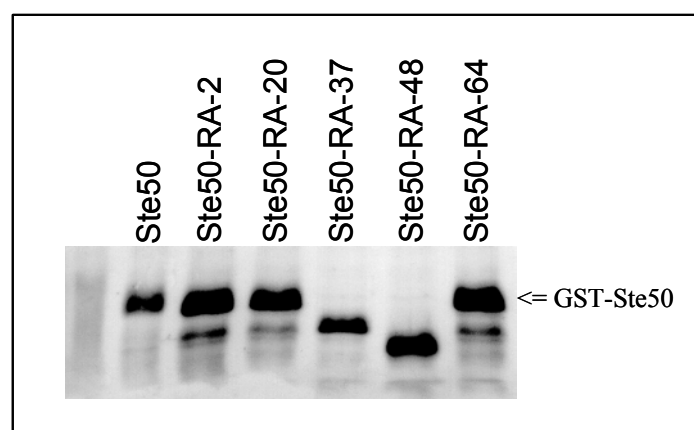


Abbildung 3.4 Expression der RA-Mutanten

Der Stamm W303-1A $\Delta ste50$ (WAM4) wurde mit den Plasmiden pEB204 und pMS7 bis pMS12 transformiert, die Proteinexpression durch Galaktose induziert. Die Zellen wurden bei OD_{600nm} 0,8 geerntet, Proteinrohextrakte hergestellt und GST-Ste50 mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Nach SDS-PAGE wurde ein Immunoblot mit Antikörper gegen GST durchgeführt.

Tabelle 3.1 Ergebnis der Sequenzierung der *STE50*-RA - Mutanten

Mutante (Plasmid)	Mutation DNA *	Mutation AS *
Ste50-RA-2 (pMS7)	A - 675 - G T - 857 - C C - 864 - T T - 873 - C C - 953 - T	V - 286 - A P - 318 - L
Ste50-RA-20 (pMS8)	A - 886 - G A - 902 - G	R - 296 - G N - 301 - S
Ste50-RA-37 (pMS9)	Deletion C - 655 Führt zu Leserasteränderung und Stop-Kodon bei AS 253	Leserasterverschiebung Stop bei 253, AS ab 217 verändert
Ste50-RA-48 (pMS11)	A - 667 - T	K - 223 - Stop
Ste50-RA-64 (pMS12)	A - 848 - G T - 965 - C	R - 283 - G L - 322 - S

* Angegeben sind die Mutationen auf DNA-Ebene (Spalte 2) und die jeweilige Folge auf AS-Ebene (Spalte 3). Zuerst ist der Originalzustand in Ste50 angegeben, dann die Position (bezogen auf ATG bzw. M = 1 von WT-Ste50) und anschließend der jeweilige Austausch in der Mutante. Aus der Leserasterverschiebung in Ste50-RA-37 ergibt sich eine veränderte AS-Sequenz, hier nicht angegeben. Die Mutante Ste50-RA-48 besitzt viele weitere Mutationen, die aufgrund des vorhergehenden Stop-Kodons nicht gezeigt wurden.

Wie man der Tabelle 3.1 entnehmen kann, ist Ste50-RA-37 aufgrund einer Leserasterverschiebung nicht verwendbar für die Analyse der RA-Funktion. Ste50-RA-48 zeigt ein verfrühtes Stop-Kodon an Position 223, bezogen auf die Aminosäuresequenz. Die anderen drei Mutanten weisen jeweils zwei veränderte Aminosäuren im C-terminalen Bereich der RA-Domäne auf. Zur weiteren Charakterisierung wurden daher die Mutanten Ste50-RA-2, Ste50-RA-20 und Ste50-RA-64 verwendet.

3.3 Charakterisierung der RAD-Mutanten

Die drei Vollängen-*STE50*-RAD-Mutanten wurden auf die Fähigkeit zur Paarung untersucht. Dazu wurde sowohl die Zellmorphologie nach α -Faktor-Induktion beobachtet, als auch der G1-Zellzyklus-Arrest sowie die Induktion eines *lacZ*-Reporterkonstruktes mit *FUS1*-Promotor (Abb 3.5).

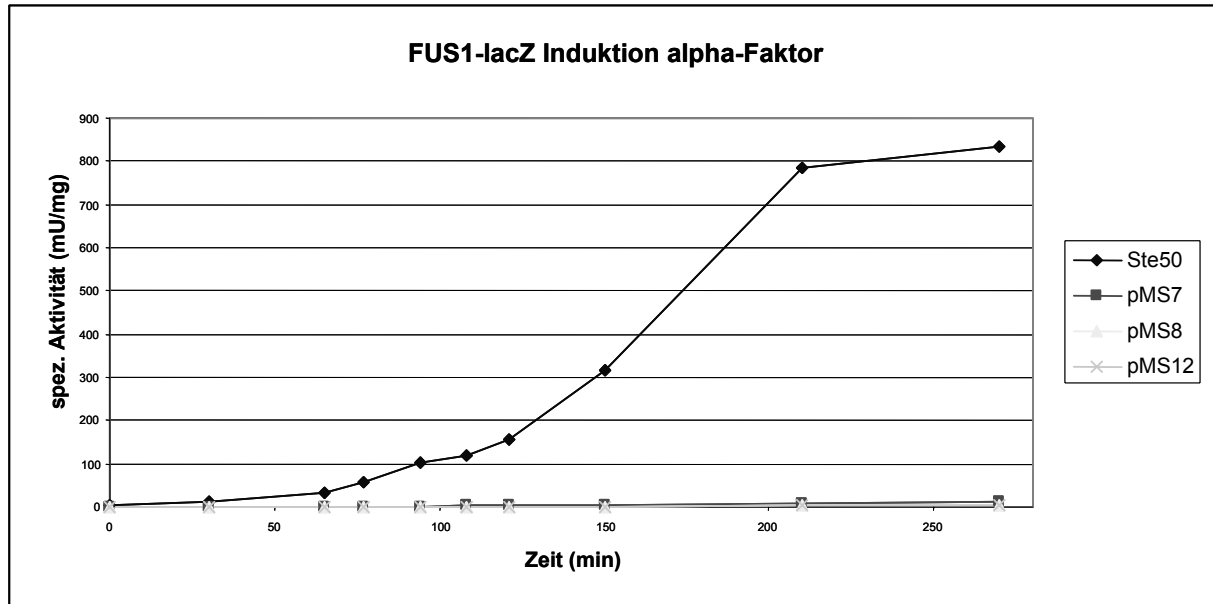


Abbildung 3.5 Charakterisierung der RA-Mutanten durch quantitative *FUS1-lacZ*-Bestimmung nach α -Faktor-Induktion

Ein W303-1A $\Delta ste50$ Stamm (WAM4) enthält jeweils zwei Plasmide: eins mit Reporterkonstrukt (*FUS1*-Promotor mit *lacZ*-Reportergen; pEGX162) und eine *Ste50*-Mutation (*GAL*-Promotor; *Ste50* (pEB204) oder pMS7, 8, 12). Nach Induktion des Paarungspheromonantwortweges mit 5 μ M α -Faktor wurden zu verschiedenen Zeiten Proben genommen und die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität in mU/mg Gesamtprotein bestimmt.

In Abbildung 3.5 ist die *lacZ*-Induktion durch α -Faktor für die jeweiligen *STE50*-Mutanten angegeben. Der Hefestamm mit WT-*Ste50* erreicht ein erstes Maximum (100 mU) bei 94 min und steigt dann von 120 bis 200 min auf ein zweites Maximum von ca. 800 mU/mg Protein an. Die Mutanten zeigen ausnahmslos keine über dem Hintergrund liegende β -Galaktosidase-Aktivität, obwohl die Proteine exprimiert werden (siehe Abbildung 3.4).

Für jede Probe aus Abbildung 3.5 wurden Zellen mit Formaldehyd fixiert und mindestens 200 Zellen unter dem Mikroskop zufällig fotografiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil von Zellen mit Paarungsfortsatz („Shmoo“) an der Gesamtzellzahl ermittelt (Shmoo-Index) sowie der prozentuale Anteil an knospenden und nicht-knospenden Zellen (Budding-Index). Die drei Mutanten verhielten sich in Bezug auf Shmoo-Index und Budding-Index wie die Negativkontrolle, auch bei einem quantitativen Paarungstest zeigten die Mutanten einen totalen Defekt (Daten nicht gezeigt).

3.4 Identifizierung von RAD-Interaktionspartnern im Two-Hybrid-Assay

In unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass Ste50 mit dem G-Protein Cdc42 interagiert (Sussmann, Hopp, Bühring und Ramzenai-Rad, unveröffentlichte Daten). Drees *et al.* haben 2001 nachgewiesen, dass Ste50 auch mit Gic1, einem Effektor von Cdc42, im Two-Hybrid-Experiment interagiert. Um herauszufinden, ob eine gestörte Interaktion mit Cdc42 oder Gic1 für den Phänotyp der RA-Mutationen (siehe 3.2) verantwortlich ist, wurde dies im Two-Hybrid-Experiment überprüft (Abbildung 3.6). Im Stamm PJ187 wurden jeweils ein Fusionsprotein mit Gal4-DNA-Bindedomäne und ein Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne koexprimiert. Getestet wurden jeweils Ste50 oder eine der RA-Mutanten mit Cdc42 oder Gic1, zudem wurde die Interaktion von Gic1 mit unterschiedlichen Ste50-Regionen auf einen Bereich eingegrenzt.

3.4.1 Analyse der Interaktion der Ste50-RA-Mutanten mit Cdc42

Wie bereits erwähnt wurde, konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Interaktion von Ste50 mit Cdc42 und etwas stärker mit einer hyperaktiven Mutante von Cdc42 (Cdc42^{Val12}) im Two-Hybrid-System gezeigt werden (Bühring und Ramezani-Rad, unveröffentlichte Daten). Die Interaktion zwischen Ste50 und Cdc42^{Val12} ist insgesamt betrachtet eher schwach, aber signifikant und reproduzierbar. Um die Interaktion der RA-Mutanten mit Cdc42 zu testen, wurden die RA-Mutationen C-terminal an die Gal4-DNA-Bindedomäne eines Two-Hybrid-Vektors kloniert (siehe Material und Methoden). Die Abbildung 3.6 A zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse.

Die „Negativkontrolle“ (1, BD-Ste50) ohne AD-Plasmid zeigt eine leichte Blaufärbung. Dies liegt daran, dass in diesem Konstrukt die ersten acht Aminosäuren von Ste50 fehlen und dadurch vermutlich dem mittleren sauren Ser/Thr-reichen Bereich eine aktivierende Wirkung ermöglichen. Bei (2, BD-Ste50C und AD-Ste50-9) handelt es sich um eine andere Negativkontrolle von Ste50-Mutanten, welche nicht miteinander interagieren (Jansen *et al.*, 2001). Es ist auch kein Wachstum auf Medium ohne Histidin oder Adenin zu beobachten. In Fall 3 sieht man eine sehr starke Interaktion zwischen BD-Ste50-4 und AD-Cdc42-Val12, bei Ste50-4 handelt es sich um eine Mutante, welche nur noch sehr schwach mit Ste11 interagiert (Jansen *et al.*, 2001). Sowohl auf Medium ohne Adenin als auch ohne Histidin ist sehr starkes Wachstum zu beobachten. WT-Ste50 und Cdc42^{Val12} (4) interagieren eher schwach, aber signifikant und reproduzierbar, wenn man nach der XGal-Überschichtung geht, auf Medium ohne Histidin oder Adenin ist kein Wachstum zu sehen. Diese ersten 4 Situationen dienten der Verifizierung früherer Ergebnisse der Arbeitsgruppe (Bühring und Ramezani-Rad, unveröffentlichte Ergebnisse). Abbildung 3.6 A) Nr. 5-9 zeigt die Analyse der neuen Ste50-RA-Mutanten auf ihre Interaktion mit Cdc42^{Val12}. Bei Ste50-RA-2 ist eine schwache Blaufärbung und schwaches Wachstum auf HIS⁻-Platten zu beobachten, was auf

A) Interaktion von Ste50 mit Cdc42	X-Gal	His ⁻	Ade ⁻
1: BD-Ste50 (Negativkontrolle)		-	-
2: BD-Ste50-C + AD-Ste50-9 (Negativ)		-	-
3: BD-Ste50-4 + AD-Cdc42-Val12		++	++
4: BD-Ste50-WT + AD-Cdc42-Val12		-	-
5: BD-Ste50-RA-2 + AD-Cdc42-Val12		+	-
6: BD-Ste50-RA-20 + AD-Cdc42-Val12		-	-
7: BD-Ste50-RA-37 + AD-Cdc42-Val12		-	-
8: BD-Ste50-RA-48 + AD-Cdc42-Val12		-	-
9: BD-Ste50-RA-64 + AD-Cdc42-Val12		-	-
B) Interaktion von Ste50 mit Gic1			
10: BD-Ste50 + AD-Gic1		+	-
11: BD-Ste50-N + AD-Gic1		-	-
12: BD-Gic1 + AD-RA		++	++
13: BD-Gic1 + AD-Cdc42-Val12		+/--	-
14: BD-Gic1 + AD-Ste50-RA-2		-	-
15: BD-Gic1 + AD-Ste50-RA-20		-	-
16: BD-Gic1 + AD-Ste50-RA-37		-	-
17: BD-Gic1 + AD-Ste50-RA-48		+/-	-
18: BD-Gic1 + AD-Ste50-RA-64		+/-	-

Abbildung 3.6 Two-Hybrid Charakterisierung der RAD-Mutanten von Ste50

Im Stamm PJ187 wurden jeweils ein Fusionsprotein mit Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) und ein Fusionsprotein mit der Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) koexprimiert. Anschließend wurden die Zellen auf mehrere Selektionsmedien gestempelt. Bei Selektion auf die Anwesenheit beider Plasmide wurde ein semiquantitativer X-Gal-Overlay-Assay durchgeführt. Die Blaufärbung ist ein Maß für die Induktion des *LacZ*-Reportergenese, abhängig von der Interaktionsstärke der getesteten Fusionsproteine. Außerdem wurde das Wachstum auf Medium ohne Histidin bzw. ohne Adenin verfolgt, dargestellt durch + (Wachstum) oder - (kein Wachstum) und entsprechende Abstufungen. Folgende Plasmide wurden verwendet: BD-Ste50 (EGX142), BD-Ste50C (EGX390), AD-Ste50-9 (EFB95), BD-Ste50-4 (EFB45), AD-Cdc42-Val12 (EFB67), BD-RA-2 bis BD-RA-64 (pS17-pS21), AD-Gic1 (pS12), BD-Gic1 (pS13), AD-RA (pS16), BD-Ste50N (EGX393), AD-RA-2 bis AD-RA-64 (pS22-pS26).

eine zwar abgeschwächte, aber fortgesetzte Interaktion mit Cdc42 deutet. Die anderen Mutanten zeigen keine Hinweise auf Interaktion mit dem konstitutiv-aktiven Cdc42. Vermutlich beruht diese gestörte Interaktion mit Cdc42 auf den Mutationen in der RA-Domäne und ist damit für die Phänotypen der RA-Mutanten verantwortlich.

3.4.2 Analyse der Interaktion der Ste50-RA-Mutanten mit Gic1

In einer großen Two-Hybrid-Untersuchung zur Identifizierung von bei polarem Wachstum beteiligten Komplexen wurde unter anderem eine Interaktion von Ste50 und Gic1 sowie von Gic1 mit Cdc42 nachgewiesen (Drees *et al.*, 2001). Bei Gic1 handelt es sich um einen Effektor von dem G-Protein Cdc42, welcher ebenfalls eine wichtige Rolle bei polarem Wachstum spielt. Die Interaktion von Ste50 mit Gic1 sollte bestätigt und auf eine Region eingegrenzt werden. Eine mögliche Störung dieser Interaktion im Falle der RA-Mutanten wurde ebenfalls untersucht. Hierfür wurden die RA-Mutanten sowie die RA-Domäne alleine an die Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Von Gic1 wurde sowohl ein AD- als auch ein BD-Fusionsplasmid hergestellt.

In Abbildung 3.6 B) (10) ist die Bestätigung der publizierten Interaktion mit BD-Ste50 und AD-Gic1 zu sehen, die Blaufärbung ist nicht so stark wie die für Ste50 mit Cdc42^{Val12}. Auf Medium ohne Histidin kann noch schwaches Wachstum beobachtet werden, auf Medium ohne Adenin hingegen nicht. Wurden für die Eingrenzung der Interaktion mit Gic1 nur die ersten 252 AS von Ste50 verwendet (BD-Ste50N), zeigt sich keine Interaktion mehr (11). Die RA-Region von Ste50 alleine (AD, AS 215-346) interagiert jedoch sehr stark mit BD-Gic1 (Abbildung 3.6 B) 12); dies ist der einzige Fall von Wachstum auf Medium ohne Adenin, wenn man von Abbildung 3.6 A) (3) absieht. (13) zeigt die eher schwache Interaktion von BD-Gic1 mit der aktiven Cdc42-Mutante. In (14-18) wurde die Interaktion der RA-Mutanten (fusioniert mit der Gal4-Aktivierungsdomäne) mit BD-Gic1 überprüft. Während Ste50-RA-2 hier keinen Hinweis auf Interaktion zeigt, sind die Zellen mit pMS11 und pMS12 blau angefärbt und zeigen auch schwaches Wachstum auf Medium ohne Histidin. Zu beachten ist, dass AD-Ste50-RA-48 (AS 1-223) eine Interaktion mit BD-Gic1 zeigt, BD-Ste50N (AS 1-252) jedoch nicht mit AD-Gic1 (siehe Diskussion). Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Wachstumstests auf Mangelmedien die Blaufärbung des X-Gal-Overlay-Assays. Lediglich für (4) zeigt sich kein Wachstum auf Medium ohne Histidin.

Ste50 und Gic1 interagieren also über die Region der RA-Domäne, allerdings scheint es sich um einen anderen Bereich der RA-Domäne zu handeln als bei der Interaktion mit Cdc42, da sich die RA-Mutanten je nach Interaktionspartner unterschiedlich verhalten.

B) Die Modifizierung von Ste50

Vermutungen, dass Ste50 in mehreren Isoformen vorliegt, ergeben sich aus dem Auftreten mehrerer Banden in SDS-Polyacrylamid-Gelen sowie aus der Schlussfolgerung, dass bei einer konstitutiven Interaktion von Ste50 mit Ste11 Ste50 irgendwie in seiner Konformation verändert werden muss, um eine differenzierte Wirkung auf Ste11 entfalten zu können.

Wu *et al.* haben 1999 die Interaktion von Ste50 und Ste11 charakterisiert, dabei wurde eine *in vitro*-Phosphorylierung von Ste50 durch Ste11 gezeigt. Die Experimente beruhen auf einem GST-Ste50-Fusionsplasmid, für welches vorher die Funktionalität nachgewiesen wurde.

In unserer Arbeitsgruppe hatten wir auch schon Hinweise auf eine Phosphorylierung von Ste50 *in vivo*. Zugabe von Phosphatase zu einem Proteinextrakt mit GST-Ste50 führte zu einem Shift der Ste50-Bande zu einer weniger stark verzögerten Form (Bühning und Ramezani-Rad, unveröffentlichte Ergebnisse).

Eine *in silico*-Analyse von Ste50 zeigt aussergewöhnlich viele Serin- und Threonin-Reste, insbesondere im mittleren Bereich. Viele davon werden von Programmen wie Netphos 2.0 als potentielle Phosphorylierungsstellen erkannt.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, die Modifizierung von Ste50 aufzuklären, insbesondere in Bezug auf eine zu vermutende Phosphorylierung von GST-Ste50. Folgende Fragestellungen galt es dabei zu bearbeiten:

1. Welche Isoformen von Ste50 treten auf?
2. Massenspektroskopische Analyse der Phosphorylierung/Modifizierung
3. Gerichtete Mutagenese von potentiellen S-Phosphorylierungsstellen
4. Zeigen die Mutanten unterschiedliche Phosphorylierungsstadien (Immundetektion)?
5. Ist die Proteinstabilität bei den Mutanten verändert?
6. Gibt es einen Einfluss der Mutationen auf die Signaltransduktionswege?

3.5 GST-Ste50 wird phosphoryliert

Bei Überexpression durch induzierten *GAL*-Promotor eines GST-Ste50-Fusionsproteins zeigt sich nach Auftrennung durch SDS-PAGE typischerweise eine der beiden in Abbildung 3.7 dargestellten Formen abhängig von der Protein-Menge: entweder zwei distinkte Banden (I+II) oder ein breites, relativ undifferenziertes Signal.

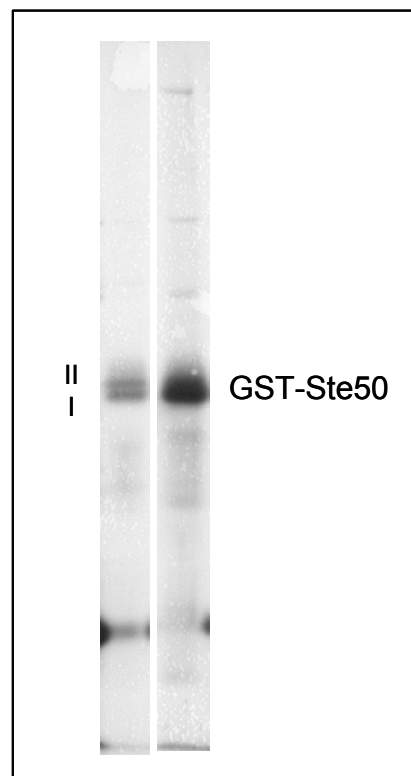


Abbildung 3.7 GST-Ste50 tritt in zwei Formen auf

Gezeigt ist ein Immunoblot von Proteinrohextrakten. Die Expression des GST-Ste50-Fusionsproteins (pEB204) erfolgte unter Kontrolle des induzierten *GAL*-Promotors in einem W303-1A $\Delta ste50 \Delta ste11$ -Stamm, der Antikörper richtet sich gegen GST.

Unter Signal-induzierten Bedingungen (Pheromon-Zugabe, Osmostress, Stickstoff-Mangel) sieht man bei Expression einer chromosomal integrierten Einzelkopie von Myc-Ste50 unter Kontrolle des *STE50*-Promotors je nach Bedingungen oberhalb der höheren Bande einen unklaren Schatten oder einen „Shift“ der gesamten Bande hin zu einer stärker retardierten Form (Hopp & Ramezani-Rad, unveröffentlichte Daten; siehe Diskussion). Die Bande für Isoform II von Ste50 ist erst nach Induktion des Pheromonantwortweges mit α -Faktor zu erkennen. Die induzierte Form von Ste50 läuft im Vergleich zur nicht-induzierten Form etwas verzögert, der Grad der Verzögerung ist allerdings je nach Signal (Salz, Nahrungsmangel, α -Faktor) unterschiedlich. Als Modifizierung kommen insbesondere Glykosylierung, Phosphorylierung oder Ubiquitinierung (zumeist nach vorheriger Phosphorylierung) in Frage. Glykosylierung konnte nach Sequenzanalyse und einer Glykoprotein-Aufreinigung mit Hilfe

von Lektin-Sepharose ausgeschlossen werden, da GST-Ste50 im Durchlauf verblieb, im Säulen-Eluat jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.8). Eine Ubiquitinierung ist wegen mangelnder Verzögerungswirkung im Gel fraglich.

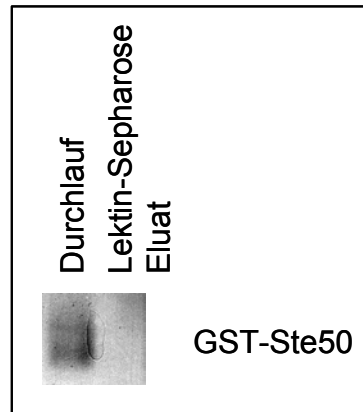


Abbildung 3.8 Test auf Glykosylierung

GST-Ste50 wurde im Stamm WAM4 exprimiert (Plasmid EB204), der Proteinrohextrakt aus 5 OD_{600nm} logarithmischen Zellen gewonnen und mit einer Lektin-Sepharose-Säule inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Elution mit SDS-Probenpuffer. Auf die SDS-PAGE folgte ein Immunoblot mit Antikörper gegen GST.

Für viele Proteine konnte nachgewiesen werden, dass ein Unterschied in der Mobilität in der SDS-PAGE durch eine Phosphorylierung des Proteins verursacht wird (u.a. Whistler & Rine, 1997). Da eine Phosphorylierung am wahrscheinlichsten war, wurde dies zunächst mit Hilfe von alkalischer Phosphatase überprüft. GST-Ste50 wurde nach Induktion des *GAL*-Promotors mit Glutathion-Sepharose aus einem W303-1A $\Delta ste50 \Delta ste11$ -Stamm aufgereinigt, mit SDS-Probenpuffer eluiert und in drei Aliquots aufgeteilt. Je ein Aliquot des Proteins wurde dann verdünnt (die SDS-Konzentration ist sonst zu hoch) und für den Phosphatase-Assay verwendet. Ein Aliquot wurde auf Eis aufbewahrt, ein weiteres Aliquot für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Das letzte Aliquot wurde mit fünf Units Calf Intestine Phosphatase (CIP) ebenfalls vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 5 min bei 95°C wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und ein Immunoblot durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

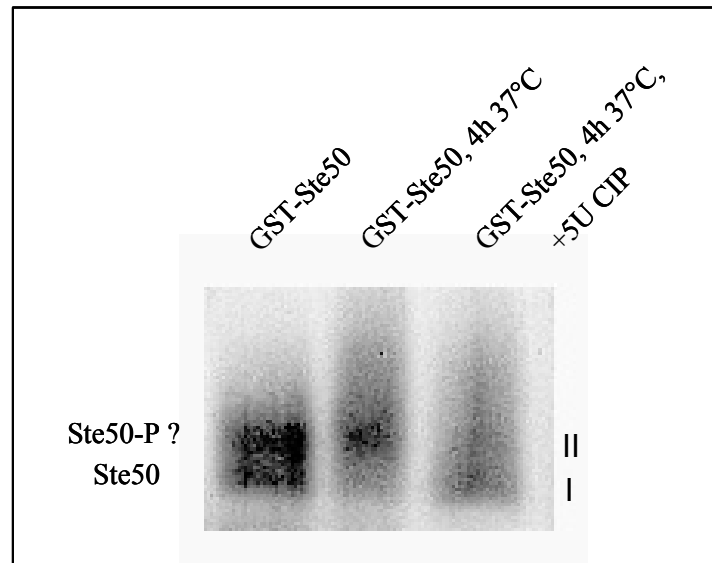


Abbildung 3.9 Wirkung von Phosphatase auf GST-Ste50

Gezeigt ist ein Immunoblot von aufgereinigtem Ste50. Die Expression des GST-Ste50-Fusionsproteins (Plasmid EB204) erfolgte unter Kontrolle des induzierten *GAL*-Promotors in einem *W303-1A-Δste50Δste1*-Stamm, der Antikörper richtet sich gegen GST. Nähere Informationen siehe Text.

In dem mit alkalischer Phosphatase behandelten Aliquot von GST-Ste50 ist die Bande niedrigerer Mobilität nicht nachweisbar (Abbildung 3.9, Spur 3). Die Inkubation bei 37°C in Abwesenheit von alkalischer Phosphatase führt nicht zum Verlust von Form II, was eine unspezifische „Band-Shift“-Aktivität ausschließt (Abbildung 3.9, Spur 2). Die Form I von GST-Ste50 nimmt nach vier Stunden Inkubation bei 37°C ab, wie Spur 2 zeigt. Dies macht eine eventuelle partielle Degradation der nicht-phosphorylierten Form I denkbar.

Folglich wird das GST-Ste50-Protein durch Phosphorylierung modifiziert. Diese Modifikation führt zu dem beobachteten Laufunterschied von Form II im Vergleich zur mobileren Form I von GST-Ste50.

Durch einen spezifischen Nachweis von Phosphoserin mit Hilfe eines Phosphoserin-Antikörpers sollte eine erste Eingrenzung vorgenommen werden und zusammen mit einer selektiven Färbung von Phosphoprotein im Gel dieses Ergebnis der Behandlung mit alkalischer Phosphatase bestätigt werden. Ein möglicher Einfluss der Induktion mit α -Faktor auf die Phosphorylierung sollte ebenfalls näher untersucht werden, weshalb Proben ohne Pheromon sowie zusätzlich zu definierten Zeitpunkten nach der Zugabe von 5 μ M α -Faktor genommen wurden. In Abbildung 3.10 sind die zusammengefassten Ergebnisse der Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ste50 mit Antikörper gegen Phosphoserin sowie der Färbung mit dem ProQ-Diamond-Floureszenzfarbstoff dargestellt.

Abbildung 3.10 A) zeigt den immunologischen Nachweis mit spezifischem Phosphoserin-Antikörper. Das obere Bild zeigt den Immunoblot mit Antikörper gegen GST, das untere Bild denselben Blot mit Antikörper gegen Phosphoserin. Der Phosphoserin-Antikörper ist spezifisch, phosphoryliertes Threonin wird nicht erkannt. Bei allen vier Zeitpunkten wird eine Serin-Phosphorylierung erkannt, bei 0 und 70 min stärker.

Das Coomassie-Gel zeigt eine klare Grundbande von GST-Ste50, darüber sind schwache Schatten zu erkennen (Abbildung 3.10 B), oberes Bild). Bei Inkubation mit dem Phosphoprotein-Floureszenzfarbstoff zeigen sich eher breite, unscharfe Banden (mittleres Bild). Besonders stark sind die Signale in den Spuren 1 und 3. Legt man jetzt das Floureszenzbild über das Coomassie-Bild (unteres Bild), so zeigt sich, dass die detektierte Phosphorylierung von Ste50 in einem relativ breiten Bereich über der Coomassie-Ste50-Grundbande auftritt. Die schwache Markierung in Spur 2 zeigt beim Phosphostain zwei Banden, die untere davon entspricht der Coomassie-Ste50-Grundbande. Eine BSA-Negativkontrolle wird beim Phosphostaining nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

Damit ist klar, dass GST-Ste50 konstitutiv an einem Serin-Rest phosphoryliert wird. Ausserdem gibt es vermutlich eine weitere Phosphorylierung an einem nicht-Serin-Rest. Der mögliche Zusammenhang zwischen Pheromon-Zugabe und Ste50-Phosphorylierung zeigte sich hier nicht eindeutig.

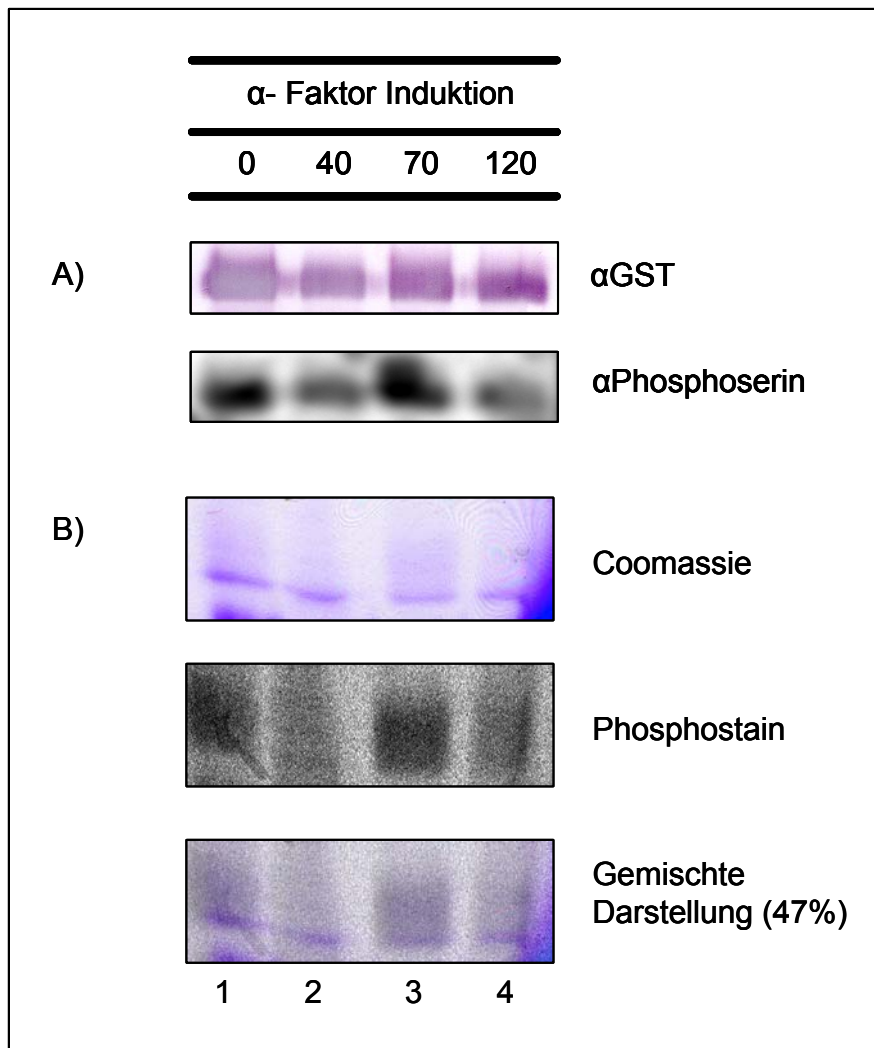


Abbildung 3.10 Phosphorylierung von GST-Ste50 durch spezifische Phosphoserin-Immunisteuerung und selektive Phosphoprotein-Färbung im Gel

Dargestellt sind die Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ste50 und eine eventuelle Abhängigkeit von der Induktion durch α -Faktor. GST-Ste50 wurde in einer Pheromonsensitiven *sst2-1* Mutante (HGX132) unter Kontrolle des induzierten *GAL*-Promotors exprimiert. Proben wurden ohne Induktion sowie 40, 70 und 120 Min nach Zugabe von α -Faktor (0,1 μ M) genommen, die resultierenden Rohextrakte durch Glutathion-Sepharose aufgereinigt. In A) wurde 1/10 der Protein-Menge für Immunoblots mit Antikörpern gegen GST und Phosphoserin verwendet. Der Phosphoserin-Antikörper ist spezifisch und erkennt keine phosphorylierten Threonin-Reste.

In B) wurde die restliche Menge an Protein aufgeteilt und für In-Gel-Detektionssysteme verwendet. Die eine Hälfte wurde mit Coomassie Blue angefärbt (B, oberes Bild), die andere mit einem Fluoreszenzfarbstoff gegen Phosphoproteine (ProQ Diamond, Molecular Probes; B, mittleres Bild). Das untere Bild ist eine Überlagerung der beiden vorherigen, die Deckkraft des Phosphostain-Images beträgt 47 %. Eine BSA-Negativkontrolle wird bei dem Phosphostaining nicht erkannt.

3.6 Gezielte Mutagenese von potentiellen Phosphorylierungsstellen in Ste50

Da eine Serin-Phosphorylierung gezeigt werden konnte (3.5), wurde damit begonnen, mögliche Phosphorylierungsstellen zunächst zu identifizieren und anschließend durch gezielte Mutagenese zu inaktivieren. Für die Identifizierung wurden die üblichen Vorhersageprogramme im Internet verwendet (Netphos 2.0; Pbase-Predict u.a.), außerdem wurde manuell nach cAMP-abhängigen Konsensus-Sequenzen gesucht, welche häufig in MAP-Kinase-Kaskaden auftreten.

Für *S. cerevisiae* wurden für die manuelle Suche die folgenden Konsensus-Sequenzen verwendet, woraus sich zusammen mit den Suchmaschinen die Auswahl der angegebenen potentiellen Phosphorylierungsstellen ergab:

<u>PKA:</u>	<u>R/k R/k x S/T</u>	<u>PKC:</u>	<u>R/k x x S/T x K/R/H</u>
S102	<u>R</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u>		
S127			<u>T</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>K</u>
S196	<u>R</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>R</u>		
S198			<u>R</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>R</u>
S202	<u>R</u> <u>R</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>V</u> <u>T</u>		
S211	<u>R</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>H</u>		
S259	<u>R</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>D</u>		

Konstruiert wurden dementsprechend die Mutationen S102A, S127A, S202A, S211A, S259A und ein Dreifach-Austausch, S196A S198A S202A (Ste50-3A). Da Serin 202 als einziges perfekt zu einer der beiden Konsensus-Sequenzen passt, wurde hier auch die Phosphorylierungs-Nachahmungsmutante S202E konstruiert. Alle Austausch-Varianten wurden im selben p416-GALp-GST-STE50 Plasmid-Hintergrund wie das ursprüngliche Expressionsplasmid (pEB204) durch gezielte PCR-Mutagenese und „PCR-Assembly“ mit anschließender homologer Rekombination erzeugt. Auch wurde die gesamte Serie mit dem Ste50-Promotor (STE50p) hergestellt.

3.7 Massenspektroskopie

Zur näheren Charakterisierung der Phosphorylierung wurden zeitgleich massenspektroskopische Untersuchungen vorgenommen und dazu ein Aufreinigungsprotokoll für größere Mengen an GST-Ste50 etabliert (siehe Material + Methoden). Für die Untersuchungen wurden Zellen für 70 min mit α -Faktor induziert und etwa 2 mg GST-Ste50-Fusionsprotein auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mit Coomassie angefärbt (Abbildung 3.11). Die sehr starke Bande in den vier Spuren entspricht der GST-Ste50-Doppelbande, darüber ist eine relativ schwache Bande zu erkennen, welche pheromon-induziertem Ste50 entspricht, sie tritt nur nach Induktion mit α -Faktor auf. Die unteren Banden sind vermutlich Abbauprodukte, welche häufig auch im Westernblot zu erkennen sind. Für die massenspektroskopische Analyse wurden drei verschiedene Proben

aus der GST-Ste50-Grundbande (1-3) entnommen sowie eine Probe aus der schwachen Bande darüber (Abbildung 3.12) und von der Firma Protagen (Dortmund) verarbeitet. Die Proben wurden mit Trypsin verdaut, und es wurden Peptidmassen-Fingerprint-Spektren angefertigt, für ausgewählte Peaks (Spaltpeptide) wurde mit MS/MS die Aminosäuresequenz bestimmt. Mit MS/MS ist die erneute Fragmentierung eines ausgewählten Spaltpeptides durch Stoß-Ionisation („post source decay“) und anschließende erneute Erstellung eines Massenspektrums gemeint. In diesem zweiten Massenspektrum zerfällt ein Spaltpeptid in seine unterschiedlichen Aminosäuren, die Anhand der Massen und Übergänge zur Aminosäure-Sequenz des untersuchten Spaltpeptides führen, eventuelle Modifikationen treten hierbei zutage und können einem definierten Aminosäure-Rest zugeordnet werden. Zunächst einmal wurde festgestellt, dass alle Proben (Spots 1-4) GST-Ste50 entsprechen. Die Intensitätsabdeckung (Zahl der detektierten GST-Ste50-Moleküle im Verhältnis zur detektierten Gesamtmolekülzahl, Indiz für chemische Sauberkeit der Probe) variiert dabei von 86-92 % (sehr sauber), die Sequenzabdeckung (Summe der massenspektroskopisch detektierten, unterschiedlichen Aminosäuren aus den GST-Ste50-Spaltpeptiden im Verhältnis zur Gesamtzahl von Aminosäuren für GST-Ste50) zwischen 40 und 65 %, je nach Spot. Für Abbildung 3.12, 4a+4b ergab sich eine Intensitätsabdeckung von 86 % und eine Sequenzabdeckung von insgesamt 65 % für das induzierte GST-Ste50.

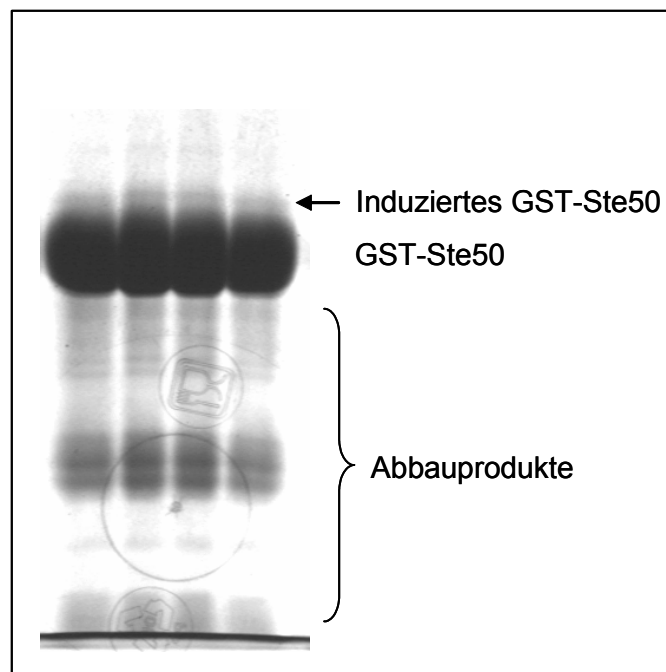


Abbildung 3.11 Coomassie-Färbung von aufgereinigtem GST-Ste50 nach 70 min Induktion mit α -Faktor

Die Expression von GST-Ste50 erfolgte unter vollständiger Induktion des *GAL*-Promotors von Plasmid EB204 im Stamm HGX132 (*sst2-1*; supersensitiv gegen α -Faktor). 6 l logarithmisch wachsender Zellen wurden mit α -Faktor behandelt (0,1 μ M) und nach 70 min geerntet. GST-Ste50 wurde mit Glutathion-Sepharose aufgereinigt und durch Größenausschlusschromatographie (30 kDa) aufkonzentriert, das gesamte erhaltene Protein (~2mg) wurde auf die gezeigten vier Spuren im SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie R Brilliant Blue gefärbt. Nähere Informationen siehe Text.

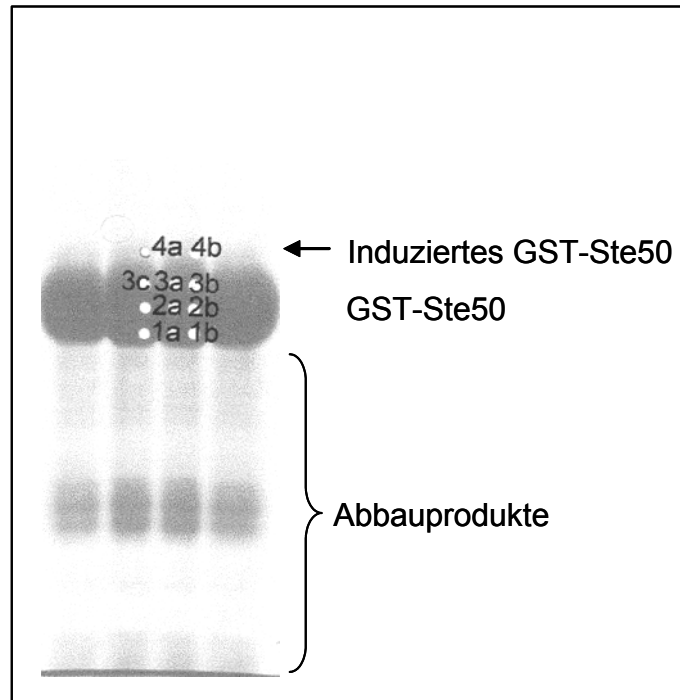


Abbildung 3.12 Auswahl von Proben für die massenspektroskopische Analyse

Gezeigt ist das Coomassie-Gel aus 3.10. Die weißen Kreise mit nebenstehender Benennung kennzeichnen die für die MS-Analyse ausgewählten Proben.

Beschränkt man sich bei der Sequenzabdeckung auf den Ste50-Anteil des Fusionsproteins, beträgt die Sequenzabdeckung immer noch 174/346 Aminosäuren = 50,3%. Die Peptid-Massen-Fingerprints zeigten bei Trypsin-Verdau keinen Hinweis auf Phosphorylierung oder sonstige Modifikationen. Mit den MS/MS-Sequenz-Daten konnte ebenfalls keine Phosphorylierung nachgewiesen werden, die Zuordnung der verschiedenen Massen als Spaltprodukte von GST-Ste50 bestätigte sich jedoch (Daten nicht gezeigt). Bei einem anschließenden Verdau mit unterschiedlichen Mengen an Chymotrypsin wurden andere Spaltpeptide der Analyse zugänglich. Zwei Massen (2292+2372) waren jetzt aufgetaucht, welche durch ein- bzw. zweifache Phosphorylierung des Peptids DTVHNRQSPSRRESPVTVF (Aminosäuren 189-207, bezogen auf Ste50) erklärt werden können. In Abbildung 3.13 (A-D) sind die Spektren nach Chymotrypsin-Verdau für die Spots 1b, 2b, 3c und 4b gezeigt. Die grün markierten Intensitätsspitzen konnten GST-Ste50 zugeordnet werden, die schwarz markierten nicht. Die beiden phosphorylierten Spaltprodukte treten im Spektrum auf der rechten Seite auf (Pfeile), die Intensität reichte nicht für MS/MS-Untersuchungen zur Bestätigung und genauen Lokalisierung der Phosphorylierung aus. Soweit vorhanden, wurde auch das zugehörige unphosphorylierte Spaltpeptid mit einem Pfeil markiert.

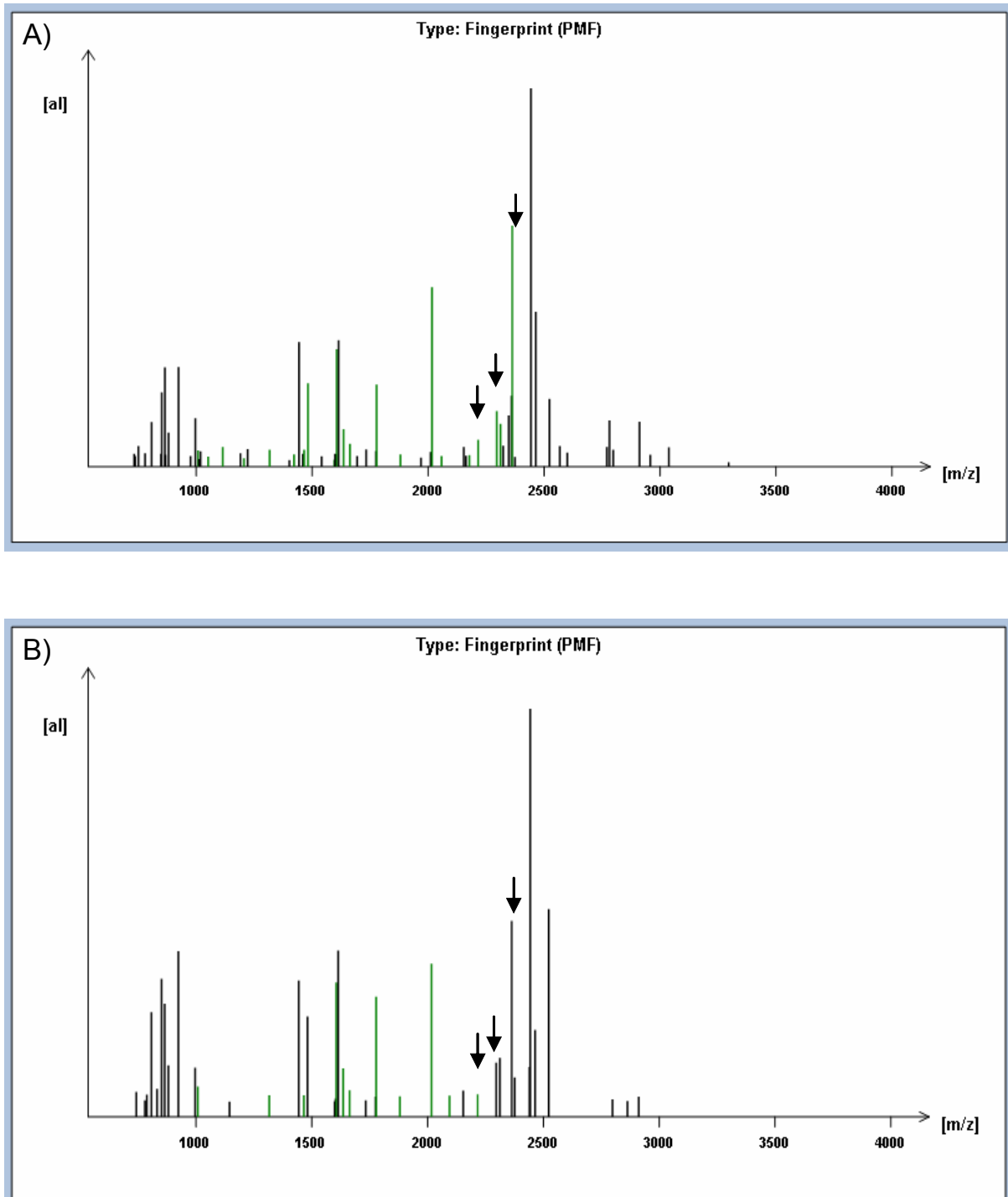


Abbildung 3.13

Massenspektren der Spots 1b (A) und 2b (B) nach Chymotrypsin-Verdau

Gezeigt sind die nach Chymotrypsin-Verdau entstandenen Spaltungsmuster der GST-Ste50-Spots. Grüne Peaks konnten GST-Ste50 zugeordnet werden, schwarze nicht. Die durch einen Pfeil markierten Peaks zeigen die auf Phosphorylierung deutenden Spaltprodukte bzw. das unphosphorylierte Peptid. Auf der Y-Achse ist die aufsummierte Intensität gezeigt, in X-Achsen-Richtung ist das Massen-Ladungsverhältnis aufgetragen.

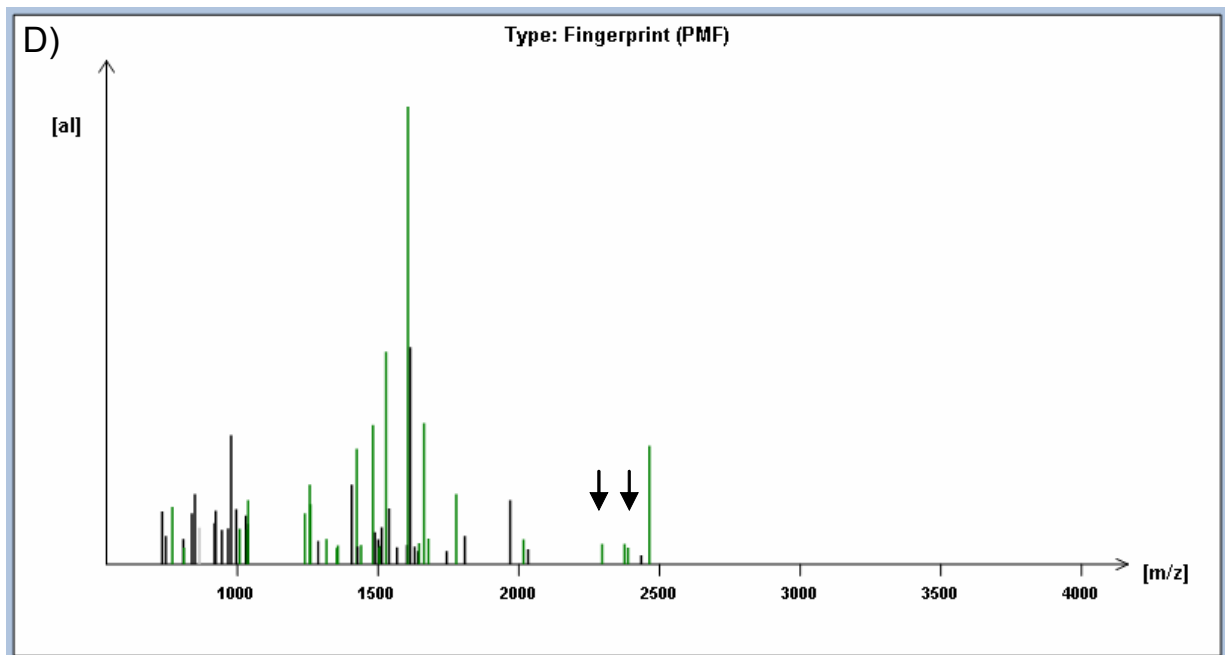
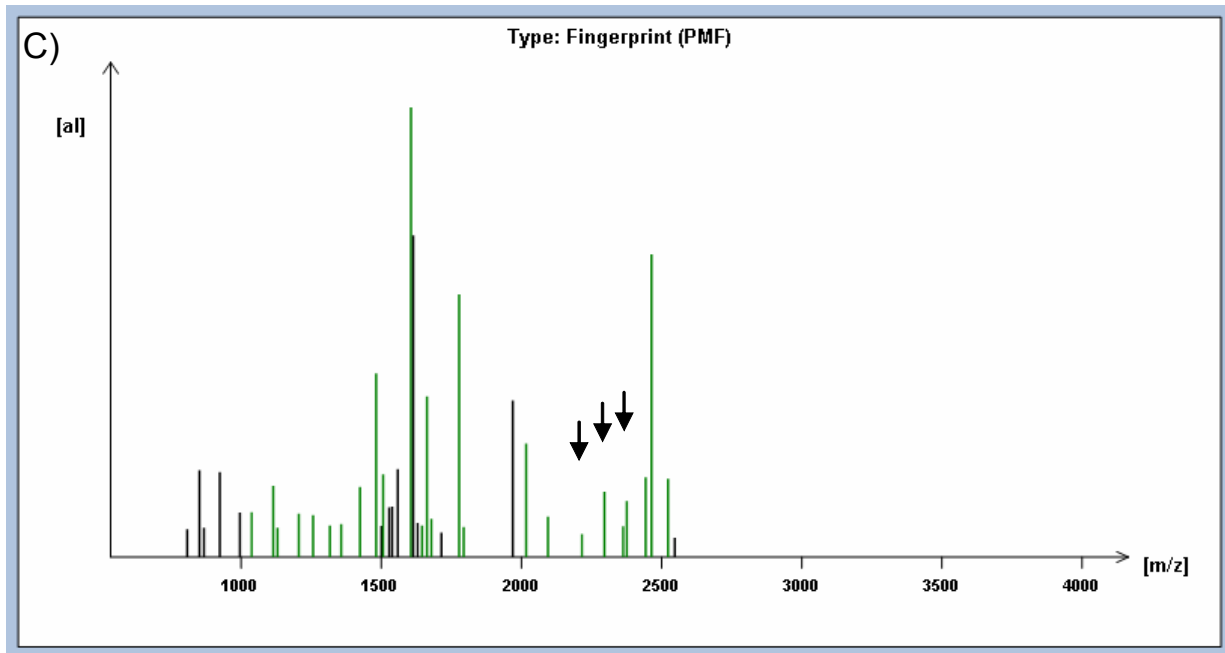


Abbildung 3.13 Fortsetzung

Massenspektren der Spots 3c (C) und 4b (D) nach Chymotrypsin-Verdau

Gezeigt sind die nach Chymotrypsin-Verdau entstandenen Spaltungsmuster der GST-Ste50-Spots. Grüne Peaks konnten GST-Ste50 zugeordnet werden, schwarze nicht. Die durch einen Pfeil markierten Peaks zeigen die auf Phosphorylierung deutenden Spaltprodukte bzw. das unphosphorylierte Peptid. Auf der Y-Achse ist die aufsummierte Intensität gezeigt, in X-Achsen-Richtung ist das Massen-Ladungsverhältnis aufgetragen.

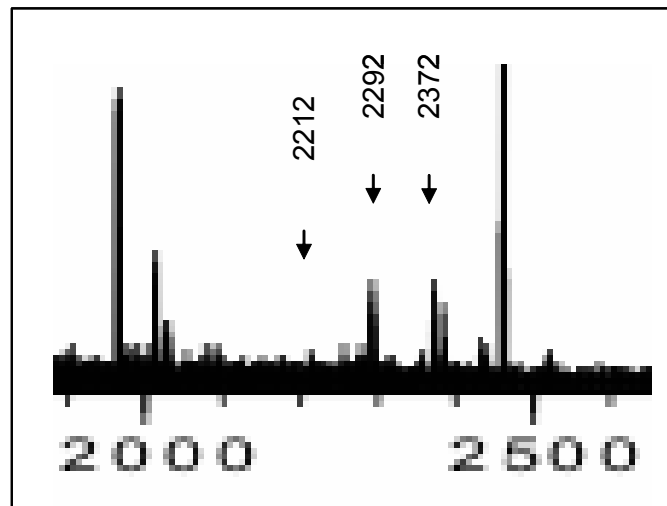


Abbildung 3.14 Ausschnitt aus dem 4b-Spektrum mit höherer Auflösung
In dieser Detailansicht ist eine Vergrößerung des Spektrums höherer Auflösung im interessierenden Bereich gezeigt, um auch das unphosphorylierte Spaltpeptid zu markieren, welches in 4b kaum vorhanden ist.

Das Verhältnis dieser phosphorylierten Peptide zum unphosphorylierten steigt mit größerem Molekulargewicht an (vgl. Tabelle 3.2), die Spot-Benennung korreliert mit Abbildung 3.12.

Tabelle 3.2 Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Peptid *

Spotbezeichnung/ Massenverhältnis	1b	2b	3c	4b
2292/2212	2,1	2,4	2,8	4,0
2372/2212	0,4	1,7	2,4	4,0

* Die massenspektroskopische Analyse von chymotryptischen Spaltprodukten resultierte in der Identifizierung zweier Massen, welche durch ein- oder zweifache Phosphorylierung desselben Spaltungspeptids erklärt werden können. Dargestellt ist das Verhältnis von ein- oder zweifach phosphoryliertem Peptid zu unphosphoryliertem Peptid in Abhängigkeit von der Annäherung an die Induktionsbande (siehe auch Abbildung 3.12 zur Probenherkunft). Die Spots 1-3 entsprechen allen Bereichen der starken GST-Ste50 Grundbande, Spot 4 hingegen ist Teil einer nur nach Induktion auftretenden diskreten schmalen Bande oberhalb von GST-Ste50.

In Tabelle 3.2 ist das Verhältnis von (1- oder 2-fach = P_1 und P_2) phosphoryliertem Peptid zum nicht-phosphorylierten Peptid (P_0) für die neu untersuchten Proben aus Abbildung 3.12 angegeben. Die Spots 1-3 entsprechen Proben zunehmender Höhe der GST-Ste50-Grundbande, Spot 4 der Induktionsbande. Überraschenderweise kommen die phosphorylierten Peptide in allen untersuchten Proben vor. Lediglich das Verhältnis der Phosphorylierungsformen zu nicht-phosphoryliertem Peptid ändert sich. Auffällig ist die starke Zunahme an doppelter Phosphorylierung im Bereich der Ste50-Grundbande (Spots 1-3, untere Reihe). Während die P_1 -Form zunächst doppelt so häufig vorkommt wie P_0 , ist das Verhältnis von P_2 -Peptid zu P_0 im ersten Spot 0,4. Das Verhältnis P_1/P_0 ändert sich bis Spot

3 kaum, P_2/P_0 steigt jedoch von 0,4 auf 2,4. Für die Induktionsbande von Ste50 (Spot 4) ist das Verhältnis beider Phosphopeptide zu P_0 gleich vier.

Im angegeben Phospho-Peptid (siehe auch Abbildung 3.15, unterstrichen) sind zwei Threonin-Reste sowie drei Serin-Reste vorhanden. Die 3 Serin-Reste fielen bereits bei der Suche nach potentiellen Phosphorylierungsstellen auf und wurden in der Ste50-3A-Mutante gegen Alanin ausgetauscht, die Mutante zeigt einen Phänotyp in der Vermittlung der Signaltransduktion (siehe 3.10-11). S202 war im vorhergehenden tryptischen Verdau zugänglich, eine phosphorylierte Bande trat aber nicht auf. Daraus kann man also auf eine Phosphorylierung der Serine S196 und S198 schließen. Die Gesamtheit der untersuchten Spaltungspeptide ist in Abbildung 3.15 dargestellt.

Protein Sequence (586 aa)				
10	20	30	40	50
MSPILGYWKI	KGLVQPTRLL	LEYLEEKYEE	HLYERDEGDK	WRNKKFELGL
60	70	80	90	100
EFPNLPYYID	GDVKLTQ SMA	IIRYIADKHN	MLGGCPKERA	EISMLEGAVL
110	120	130	140	150
DIRYGVSRIA	YSKDPETLKV	DPLSKLPEML	KMPEDRLCHK	TYLNGDHVTH
160	170	180	190	200
PDFMLYDALD	VVLYMDPMCL	DAFPKLVCFK	KRIEAIPOID	KYLKSSKYIA
210	220	230	240	250
WPLOGWQATF	GGGDHPPKSD	LIEGRGIPGN	SISSLSIPST	MEDGKQAIN E
260	270	280	290	300
GSNDASPDLD	VNGTILMNE	DFSQWSVDDV	ITWCISTLEV	EETDPLCQRL
310	320	330	340	350
RENDIVGDL L	PELCLQDCQD	LCDGDLNKAI	KFKILINKMR	DSKLEWKDDK
360	370	380	390	400
TQEDMITVLK	NLYTTTSAKL	QEFQSQYTRL	RMDVLDVMKT	SSSSSPINTH
410	420	430	440	450
GVSTTVPSSN	NTIIPSSDGV	SLSQTDYFDT	VHNRCSPTRR	ESPVTVPROP
460	470	480	490	500
SLSHSKSLHK	DSKNKVPQIS	TNQSHPSAVS	TANTPGPSPN	EALKQLRASK
510	520	530	540	550
EDSCERILKN	AMKRHNLA DQ	DWRQYVLVIC	YGDQERLLEL	NEKPVII FKN
560	570	580		
LKQQGLHPAI	MLRRRGDFEE	VAMMNGSDNV	TPGGRL	

Abbildung 3.15 Darstellung der massenspektroskopisch analysierten Bereiche von GST-Ste50

Für die Induktionsbande von GST-Ste50 (entsprechend den Spots 4a+b aus Abbildung 3.12) ist der durch Trypsin- und Chymotrypsinverdau zugängliche Bereich grau unterlegt dargestellt. Der N-terminale GST-Tag reicht bis AS 240, bei AS 241 beginnt Ste50. Das Spaltpeptid, für das eine Phosphorylierung gezeigt wurde, ist unterstrichen (429-447), die Phosphorylierungsstellen sind eingekreist (S196, S198).

Die Gesamtheit der in Form von Spaltprodukten nach Trypsin- oder Chymotrypsin-Verdau untersuchten Bereiche von induziertem GST-Ste50 ist grau unterlegt in Abbildung 3.15 zu sehen. Der Ste50-Bereich des Fusionsproteins beginnt bei AS 241, der vorherige Teil gehört zur Glutathion-S-Transferase (GST). Die nach Trypsin-Verdau durchgeführten MS/MS-Untersuchungen der intensivsten Peaks betrafen größtenteils den GST-Bereich des Proteins und wurden hier daher nicht extra markiert. Allerdings wurden fast alle Fingerprint-Zuordnungen für den Trypsin-Verdau durch die MS/MS-Untersuchungen bestätigt! Außer den oben genannten Hinweisen auf eine ein- und zweifache Phosphorylierung von Ste50 AS 189-207 (entsprechend 429-447 in Abbildung 3.15, bezogen auf das Fusionsprotein) sind

keine Hinweise auf Modifizierungen gefunden worden. Die einzige Ausnahme ist eine mögliche Oxidation des Trypsin-Spaltpeptides 275-283 (HNLADQDWR) an Tryptophan 282, was jedoch vermutlich auf die Protein-Überexpression zurückzuführen ist. Besonders der N-Terminus von Ste50 inklusive SAM-Domäne war der Analyse kaum zugänglich.

Die im Fingerprint aufgetretenen Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste ohne Phosphorylierungshinweise sind hier noch einmal separat aufgelistet mit der Angabe, ob Austausch-Mutationen (M) durch gezielte Mutagenese (siehe 3.6) untersucht wurden, die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von Ste50:

T53, S102 (M), S135, T138, S211 (M), S213, S215, S217, S230, T231, S234, S237, S240, T241, T244, S248, S259 (M), S263, Y285, Y291.

Zusammenfassend wurde in der massenspektroskopischen Analyse eine Phosphorylierung der Serine S196 und S198 gezeigt. Der Anteil an zweifach phosphoryliertem Peptid steigt mit steigendem Molekulargewicht der untersuchten Proben an, was eine Verbindung von Phosphorylierung und α -Faktor-Induktion nahelegt (siehe Diskussion). Diese Positionen liegen in der Ser/Thr-reichen Region in der Mitte von Ste50, statt wie zu vermuten gewesen wäre im Bereich der RA-Domäne (eine Deletion dieses mittleren Bereichs war angeblich voll Funktionsfähig; Wu *et al.*, 1998; siehe Diskussion)!

3.8 Phosphorylierungsstatus von Ste50-3A (S196A S198A S202A)

Das Laufverhalten der Phosphorylierungsaustausch-Varianten von Ste50 (3.6) wurde mit und ohne α -Faktor-Induktion im Immunoblot untersucht. Einzig bei GST-Ste50-3A, bei welcher die in der massenspektroskopischen Untersuchung als phosphoryliert nachgewiesenen Serin-Reste S196 und S198 sowie das benachbarte Serin202 in nicht-phosphorylierbares Alanin ausgetauscht wurden, zeigte sich ein Unterschied im Vergleich zu WT-Ste50, dargestellt in Abbildung 3.16.

Das Laufverhalten von aufgereinigtem Protein wurde im Immunoblot untersucht, jeweils in Abhängigkeit von der Induktion des Paarungspheromonweges durch α -Faktor. Abbildung 3.16 A zeigt das Laufverhalten von WT-Ste50 und Ste50-3A nach Aufreinigung mit Glutathion-Sepharose in Abhängigkeit von der Signalinduktion. Man erkennt für WT-Ste50 einen schwachen Shift (Vergleiche Spur 1+2) nach oben bei Zugabe von α -Faktor. Außerdem ist über diesem Bereich eine weitere sehr schwache Bande zu erkennen, welche bei Induktion verstärkt auftritt. Die Austauschvariante Ste50-3A hingegen zeigt mit und ohne α -Faktor nur die niedrige Ste50-Bande, ein Shift nach oben erfolgt nicht. Auch die erhöhte zusätzliche Bande tritt hier nicht auf.

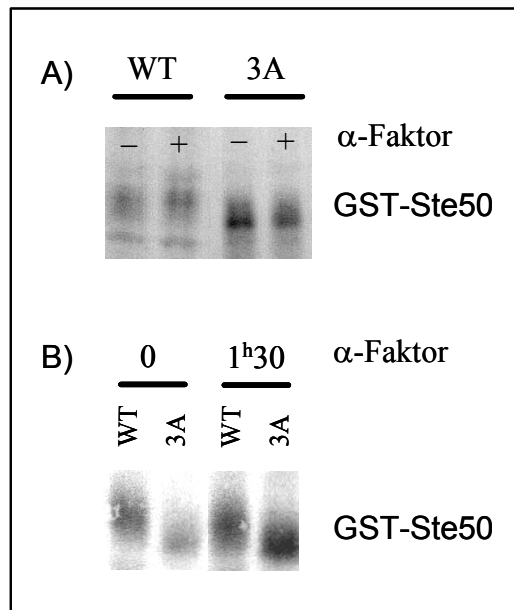


Abbildung 3.16 Wirkung der α -Faktor-Induktion auf den Phosphorylierungszustand von GST-Ste50 und GST-Ste50-3A

Gezeigt ist ein Immunoblot mit Antikörpern gegen GST. Es wurden Protein-Rohextrakte aus 4 OD_{600nm} logarithmisch wachsenden Zellen des Stammes W303-1A $\Delta ste50$ (WAM4) gewonnen, die entweder *STE50p*-GST-WT-*STE50* (pS44) oder *STE50p*-GST-*STE50*-3A (pS49) exprimierten. Anschließend wurde das GST-Fusionsprotein entweder mit Glutathion-Sepharose (A) oder durch Immunpräzipitation (B) aufgereinigt. Die Proben wurden vor Induktion mit 5 μ M α -Faktor (- in A, 0 in B) oder 90 Min danach (+ in A, 1^h30 in B) gewonnen.

Abbildung 3.16 B) stellt die Ergebnisse für ein ähnliches Experiment mit immunpräzipitiertem Protein dar. Zur Verifizierung der α -Faktor-unabhängigen Laufunterschiede von Ste50-3A und WT-Ste50 wurden diese jetzt nebeneinander aufgetragen, nach 90 min α -Faktor Induktion wurden noch einmal Proben genommen. In der Tat ist bereits ohne α -Faktor ein Laufunterschied zu beobachten, der sich nach Zugabe von α -Faktor nicht ändert. WT-Ste50 zeigt hier nur eine Bande, welche im Vergleich zu A) der oberen α -Faktor induzierten Form von GST-Ste50 entspricht. Ein Shift nach Pheromon-Induktion ist in B) nicht zu erkennen. Auffällig ist auch das im Vergleich zu WT-Ste50 deutlich verstärkte Signal für Ste50-3A nach 90 min. Vor der Zugabe von α -Faktor ist noch mehr WT-Ste50 als Ste50-3A zu erkennen. Dies deutet auf eine Proteinstabilisierung für Ste50-3A hin.

Ste50-3A wird hier also im Gegensatz zu WT-Ste50 weder durch α -Faktor-Induktion, noch konstitutiv phosphoryliert, da kein „band shift“ zu beobachten ist und Ste50-3A immer niedriger läuft als WT-Ste50.

3.9 Analyse der Proteininstabilität von Ste50-3A im Vergleich zu WT-Ste50

Der Hinweis auf eine stabilisierende Wirkung der Ste50-3A-Variante (3.8) wurde näher untersucht. Da in Abbildung 3.16 die verwendete Aufreinigungsmethode das Ergebnis beeinflusst, sollte diese jetzt noch einmal mit Rohextrakten wiederholt werden. Dadurch wird auch eine möglicherweise selektive, präferentielle Aufreinigung je nach Phosphorylierungszustand ausgeschlossen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

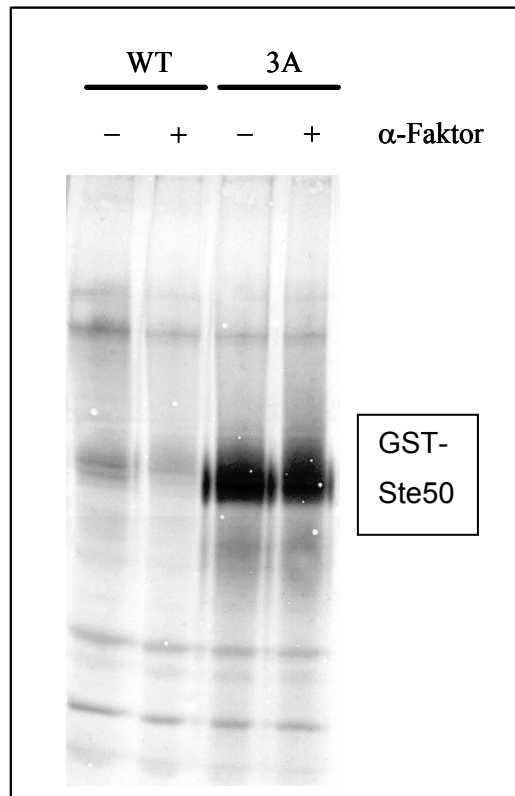


Abbildung 3.17 Untersuchung zur Proteininstabilität

Immunoblot von unaufgereinigten Rohextrakten mit gleichem Gesamtprotein-Gehalt ($\sim 60 \mu\text{g}$ Gesamtprotein aus je 4 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ -Zellen) für WT-Ste50 (pS44) und Ste50-3A (pS49) unter Kontrolle des Ste50-Promotors, exprimiert in logarythmisch wachsenden Zellen des Stammes WAM4. Zum Vergleich sind jeweils Proben vor (-) und 90 min nach (+) Zugabe von α -Faktor ($5 \mu\text{M}$) gezeigt. Der Antikörper richtet sich gegen GST. Nähere Einzelheiten siehe Text.

Rohextrakte mit gleicher Protein-Gesamtkonzentration wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Antikörper gegen GST entwickelt. Unabhängig von einer α -Faktor-Induktion zeigte sich ein sehr viel größerer Anteil von Ste50-3A am Extrakt, als dies für WT-Ste50 der Fall ist. Für WT-Ste50 scheint eher eine schwache Abnahme nach Induktion, bei gleichzeitiger Verschiebung zu Isoform II mit größerer Verzögerungswirkung im Gel beobachtet werden zu können. Die unspezifischen Hintergrundbanden unterscheiden sich in der Intensität hingegen kaum.

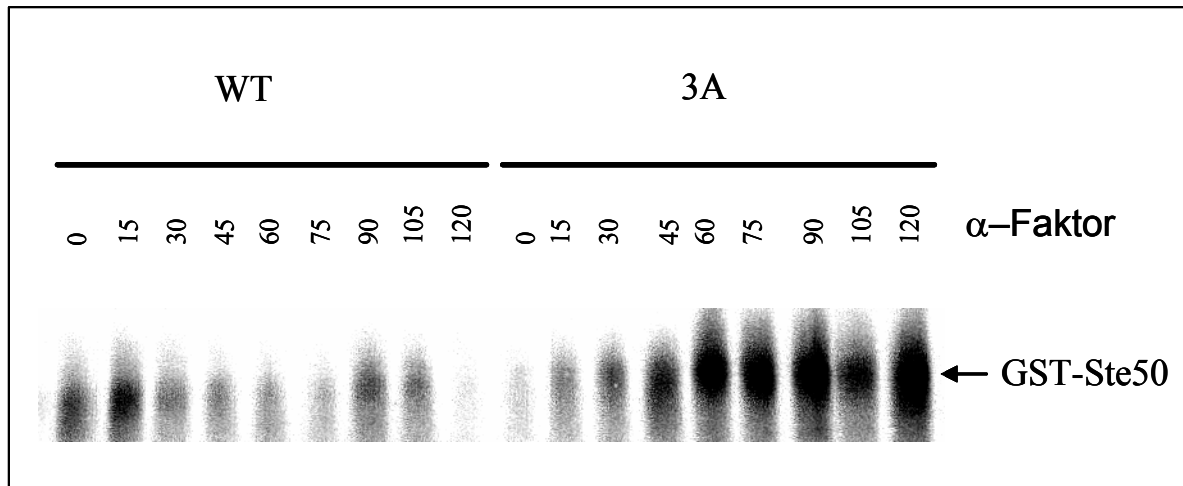


Abbildung 3.18 Zeitlicher Verlauf der Proteinstabilität für WT-Ste50 (WT) und Ste50-3A (3A) nach Induktion mit α -Faktor

25 μ l an IP-gereinigtem Protein aus 4 OD_{600nm} logarithmischen Zellen wurden für WT-Ste50 und Ste50-3A zu den angegebenen Zeiten nach Induktion des Pheromonantwortweges mit α -Faktor (5 μ M Endkonzentration) im Gel aufgetrennt, der Antikörper im Immunoblot richtete sich gegen GST. Die Expression erfolgte im Stamm WAM4 von den Plasmiden pS44 (WT) und pS49 (3A), beide unter Kontrolle des *STE50*-Promotors. Es handelt sich um steady-state-Untersuchungen, die Protein-Synthese wurde nicht unterbrochen.

Ein weiterer Hinweis auf eine Stabilisierung von Ste50 in der Austauschmutante 3A ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Da *CEN*-Plasmide mit *STE50*-Promotor verwendet wurden, kam es nur zu einer sehr geringen Expression der Fusionsproteine. Die aus der Aufreinigung durch Immunpräzipitation resultierende Proteinmenge ist unter den verwendeten Bedingungen im Bereich der Nachweisgrenze, daher musste der Blot sehr viel länger entwickelt werden, was auch zu den unscharfen Banden führt. Die Menge an WT-Ste50 nimmt im Zeitverlauf ab, bei 90 min ist allerdings noch einmal eine Erhöhung zu beobachten, die aber ebenfalls abnimmt. Für die Austauschmutante Ste50-3A ergibt sich das gegenteilige Bild, die Proteinmenge nimmt hier im Zeitverlauf zu. Ab 60 min ist die Menge an Ste50-3A dann relativ stabil, nimmt bei 105 min noch einmal ab, um danach wieder auf das vorherige Niveau zu steigen.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass die Mutante Ste50-3A bei Expression unter Kontrolle des eigenen Promotors eine deutlich erhöhte Proteinstabilität aufweist, während WT-Ste50 nach Zugabe von α -Faktor verstärkt abgebaut wird. Allerdings ist bei WT-Ste50 auch ein möglicher zyklischer Einfluß zu erkennen, da es noch einmal zu einem kurzen Anstieg bei 90 min kommt.

3.10 Phänotypische Charakterisierung der Ste50-3A-Mutante im Signaltransduktionsweg der Pheromon-Antwort

Für den Pheromonantwortweg wurde von allen konstruierten Serin-Austausch-Mutanten die morphologische Veränderung (Shmoo-Bildung) nach Induktion mit α -Faktor am Mikroskop beobachtet und eine quantitative Auswertung zur Ermittlung von Shmoo-Index und Budding-Index durchgeführt. Dazu wurden jeweils mindestens 200 Zellen pro Zeitpunkt und Probe zufällig fotografiert und anschließend ausgewertet. Zudem wurde die *FUS1*-Aktivierung durch Pheromon-Zugabe anhand eines *lacZ*-Reporterkonstruktes quantitativ ermittelt. Von den sieben konstruierten Serin-Austauschmutanten zeigte lediglich Ste50-3A signifikante Unterschiede in der Pheromon-Antwort im Vergleich zum Wildtyp, alle anderen verhielten sich wie die Wildtyp-Kontrolle. Daher ist in Abbildung 3.19 die *FUS1-lacZ*-Antwort auf α -Faktor-Induktion nur für die Austauschmutante Ste50-3A und die entsprechenden Kontrollen gezeigt. *FUS1* ist ein Zielgen der Pheromon-MAP-Kinase-Kaskade.

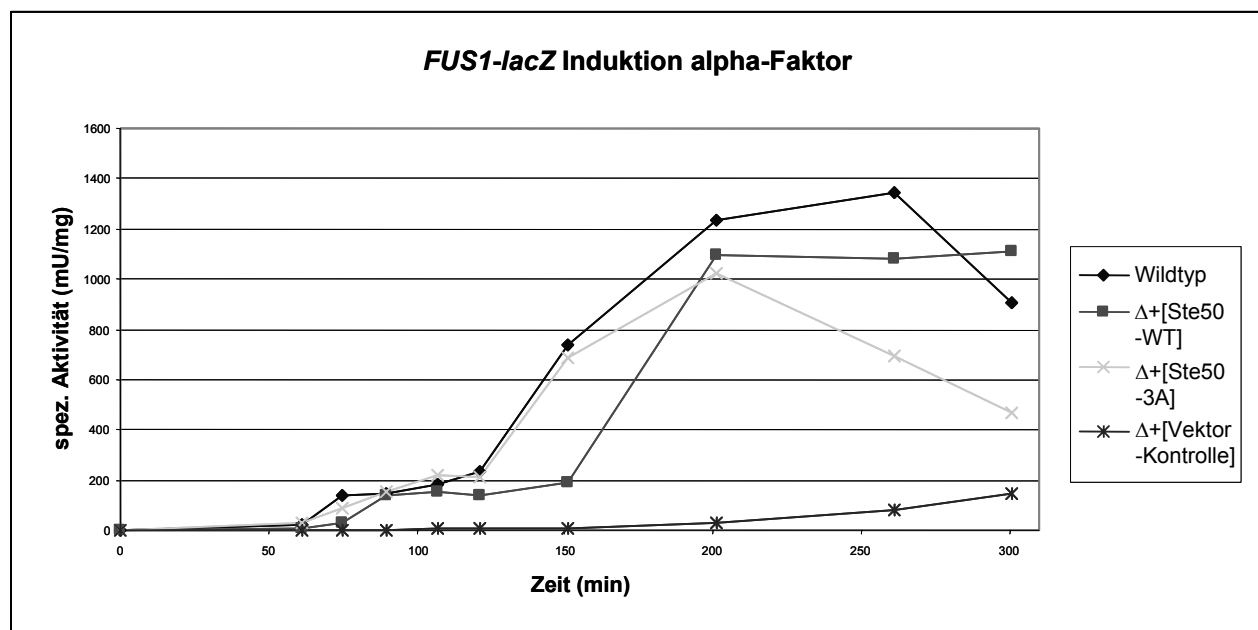


Abbildung 3.19 Auswirkung von Ste50-3A auf die Pheromon-induzierte β -Galaktosidase-Aktivität

Der Stamm W303-1A (Wildtyp) wurde mit einem *FUS1-lacZ*-Reporterkonstrukt transformiert, der Stamm W303-1A $\Delta ste50$ (WAM4, Δ) mit *GAL1p-GST-STE50-WT* (pEB204, Ste50-WT), *GAL1p-GST-STE50-3A* (pS41, Ste50-3A) und einem Leervektor (p416*GAL1*, Vektorkontrolle) sowie jeweils auch mit dem Reporterkonstrukt. Die Proben wurden zu den angezeigten Zeiten nach α -Faktor-Induktion (5 μ M Endkonzentration) entnommen, Rohextrakte präpariert und mit ONPG die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität in mU/ mg Gesamtprotein ermittelt. Es handelt sich um Mittelwerte von zwei Doppelbestimmungen, die Abweichung beträgt maximal 10%.

Die Austauschmutante Ste50-3A zeigt eine ähnlich starke Induktion der *lacZ*-Expression durch α -Faktor wie WT-Ste50, allerdings ist der Anstieg nicht ganz so steil (Abbildung 3.19). Der Hauptunterschied zwischen Ste50-3A und WT-Ste50 ist allerdings der starke Rückgang bei der Austauschmutante von 1020 mU bei 200 min über 700 mU bei 260 min auf 470 mU bei 300 Min, während WT-Ste50 konstant um 1100 mU schwankt. Der Kontrollstamm mit Leervektor zeigt erwartungsgemäß kaum Aktivität, erst ganz zum Schluss kommt es zu einer Ste50-unabhängigen Aktivierung des *FUS1-lacZ* Reporterkonstruktes. Der Stamm ohne Ste50-Deletion reagiert etwas schneller auf die Pheromonzugabe als WT-Ste50 vom Plasmid, erreicht aber ein höheres Maximum (1343 mU bei 260 Min) und fällt dafür auch etwas schneller ab auf 905 mU bei 300 Min.

Ste50-3A zeigt einen Defekt in der Aufrechterhaltung der Pheromon-abhängigen *FUS1*-Induktion von 200 bis 300 min, während die direkte Antwort auf Pheromon-Induktion während der ersten 120 min intakt bleibt.

In Abbildung 3.20 sind Phasenkontrastaufnahmen von Hefezellen dargestellt, um die morphologischen Veränderungen nach Zugabe von α -Faktor aufzuzeigen. A) zeigt Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur im Zustand der Teilung/Knospung (Budding). In B) sind typische Paarungsfortsätze nach Einwirkung mit Paarungspheromon gezeigt. In C) sind abnorme Shmoos (stark verlängert, gleichzeitige Ausprägung von zwei Fortsätzen) gezeigt. Diese entstehen auch in *Ste50* Deletionsstämmen nach längerer Inkubation mit hoher Konzentration von α -Faktor (Wu *et al.*, 1999). Für die Erstellung des Shmoo-Indexes wurden normale und abnorme Shmoos (Multi-shmoos) zusammengefasst und nicht weiter unterschieden.

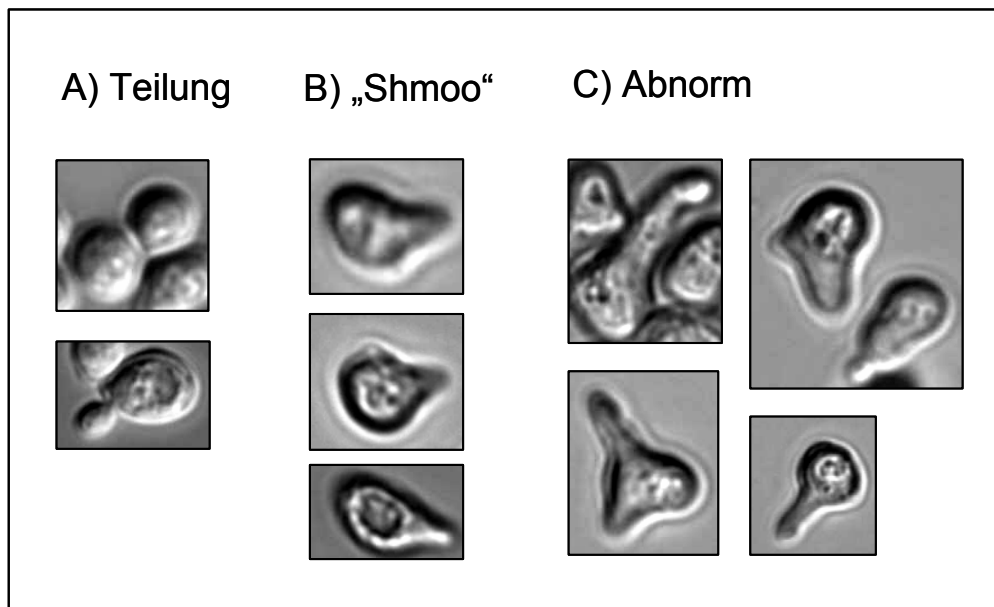


Abbildung 3.20 Morphologische Reaktion auf α -Faktor

Zur Veranschaulichung sind Phasenkontrastaufnahmen mit einem 100er Objektiv gezeigt. In A) sind teilende Zellen (Budding) gezeigt, in B) normale Paarungsfortsätze (Shmoo). In C) sind abnorme oder doppelte Shmoos zu sehen, welche nach längerer Zeit als Reaktion auf die unnatürlich hohe Konzentration an α -Faktor entstehen (auch bei $\Delta ste50$).

In den folgenden Abbildungen 3.21 A) und B) sind weitere Auswirkungen des Pheromonantwortweges für die Austauschmutante *Ste50-3A* untersucht worden: die Ausbildung von „Shmoos“ (A) sowie der G1-Zellzyklus-Arrest [anhand des prozentualen Anteils von knospenden zu nicht-knospenden Zellen, „Budding-Index“] (B).

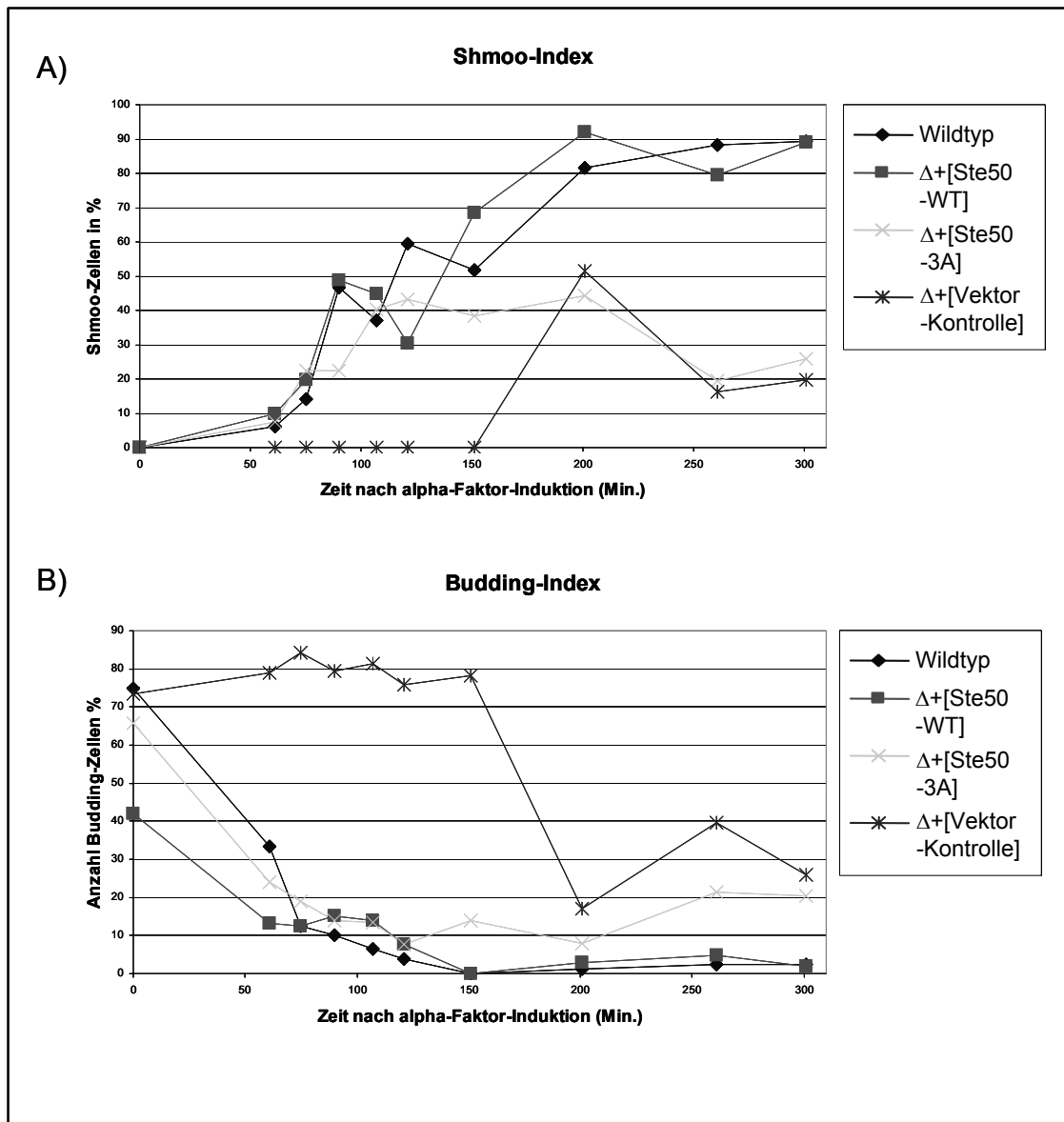


Abbildung 3.21 Auswirkungen der Austauschmutante Ste50-3A auf die morphologische Veränderung („Shmoo“-Index, A) und den G1-Zellzyklus-Arrest („Budding“-Index, B)

Der Stamm W303-1A (Wildtyp) wurde mit einem *FUS1-lacZ*-Reporterkonstrukt transformiert, der Stamm W303-1A Δ *ste50* (WAM4, Δ) mit *GAL1p-GST-STE50-WT* (pEB204, Ste50-WT), *GAL1p-GST-STE50-3A* (pS41, Ste50-3A) und einem Leervektor (p416*GAL1*, Vektorkontrolle) sowie jeweils auch mit dem Reporterkonstrukt. Die Proben wurden zu den angezeigten Zeiten nach α -Faktor-Induktion (5 μ M Endkonzentration) entnommen, für die Erstellung der beiden Indices wurden für jede Probe aus Abbildung 3.19 (*FUS1-lacZ*) Zellen mit Formaldehyd fixiert und später am Mikroskop jeweils mindestens 200 Zellen zufällig fotografiert und ausgezählt. Für den Shmoo-Index wurden alle Zellen mit wahrnehmbarer morphologischer Veränderung (100er Objektiv) ins Verhältnis gesetzt zur Gesamtzahl an Zellen, Angaben in Prozent. Entsprechendes gilt für den Budding-Index, bei dem der Anteil von knospenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in Prozent angegeben ist. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Aus Abbildung 3.21 A) wird ersichtlich, dass die Austauschmutante Ste50-3A ein Maximum von etwa 40-45% Shmoo-Zellen für den Zeitraum von 100 bis 200 min erreicht und dann auf 20-25% absinkt, denselben Anteil, wie ihn der Deletionsstamm mit Leervektor zeigt. Demgegenüber erreichen der Wildtyp-Stamm und der $\Delta ste50$ -Stamm mit WT-STE50-Plasmid ein Maximum von 80-90% für den Zeitraum von 200-300 min.

Hier ist also zunächst der deutlichste Effekt für Ste50-3A zu beobachten. Die Austauschmutante zeigt als Maximum nicht einmal halb soviel Shmoo-Bildung wie WT-Ste50 und sinkt deutlich ab, während WT-Ste50 nach 300 min immer noch stabil bei 90 % Zellen mit Paarungsfortsatz bleibt.

Nicht ganz so deutlich fällt der Effekt von Ste50-3A auf den Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase (Abbildung 3.21 B) aus. Während Zellen ohne Ste50 für die ersten 150 min durchgehend einen Anteil an knospenden Zellen von 70 bis 85% besitzen, um dann auf 18% abzufallen und sich daraufhin um die 30% einzupendeln, sinken die Werte für die Variante und die beiden WT-Kontrollen innerhalb der ersten 60 min ähnlich stark ab auf Werte zwischen 10 und 20%. Im Zeitraum von 60 bis 120 min geht der Anteil teilender Zellen auf 5-10% zurück. Erst jetzt zeigt sich auch hier ein Effekt für Ste50-3A, der Anteil teilender Zellen pendelt im Zeitraum von 120 bis 200 min zwischen 10 und 15%, während die Zellen mit WT-Ste50 nur noch 0-3% teilende Zellen besitzen. Bei 260 und 300 min hat sich Ste50-3A bereits auf Werte von 20 % erholt, die Zellen mit WT-Ste50 bleiben hingegen bei 2,5%.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der α -Faktor-induzierte G1-Zellzyklus-Arrest bei Ste50-3A zunächst wie bei WT-Ste50 stattfindet, sich die Zellen mit Ste50-3A aber deutlich schneller als diejenigen mit WT-Ste50 vom G1-Arrest erholen können (Adaption).

3.11 Auswirkungen von Ste50-3A auf die Osmostressantwort

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Verhalten der Austauschmutanten auch im HOG-Signalweg untersucht. Dabei sollte insbesondere festgestellt werden, ob wie in anderen Fällen auch eine differenzierte Antwort einer Mutante in den verschiedenen Signaltransduktionswegen zu beobachten ist oder ob es sich wie bei den Ste50-RA-Mutanten (3.2) eher um Nullmutanten handelt. Da auch in diesem Signaltransduktionsweg nur bei Ste50-3A ein relevanter Unterschied im Vergleich zu WT-Ste50 festgestellt wurde, ist das Ergebnis wiederum nur für Ste50-3A und die entsprechenden Kontrollen gezeigt (Abbildung 3.22).

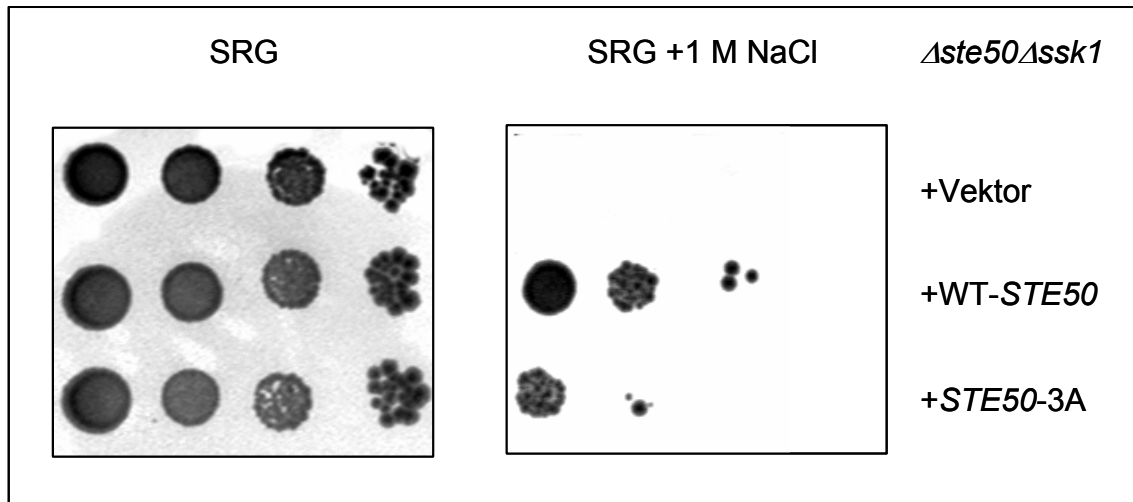


Abbildung 3.22 Osmotoleranz der Ste50-3A-Austauschmutante im Vergleich zu WT-Ste50 im HOG-Signalweg

Gezeigt ist das Wachstumsverhalten eines osmosensitiven Stammes (W303-1A $\Delta ste50\Delta assk1$, HCH100) nach Transformation mit einer Vektorkontrolle (Vektor, p416GAL1), WT-Ste50 ($STE50p$ -GST- $STE50$, pS44) oder Ste50-3A ($STE50p$ -GST- $STE50$ -3A, pS49). Aus logarithmisch wachsenden Kulturen wurden Verdünnungsreihen (von links nach rechts, von OD_{600nm} 0,4 ausgehend, um je einen Faktor 10 stärker verdünnt) auf festes SRG-Medium (synthetisches Minimal-Medium mit 3% Raffinose und 1% Galaktose) mit (rechts, SRG + 1 M NaCl) und ohne Salz (links, SRG) getropft und das Wachstum verfolgt.

Bei Medium mit 0,7 M NaCl war kein Unterschied zwischen Ste50-3A und Ste50-WT zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Während alle Zellen auf Medium ohne Salz gleich gut wachsen können, zeigt sich bei stark hoch-osmolarem Medium (SRG + 1 M NaCl) ein Wachstumsdefekt für Ste50-3A. Der Stamm mit der Vektorkontrolle kann hier nicht wachsen (Abbildung 3.23; obere Reihe, rechts) und bestätigt damit die Osmo-Sensitivität. Zellen mit WT-Ste50 wachsen hier schlechter als auf Medium ohne Salz, nach der zweiten Verdünnung (entspricht 1:100, 3.Spalte) sind nur Einzelkolonien gewachsen. Die Zellen mit Ste50-3A zeigen sogar schon nach einem Verdünnungsschritt ein entsprechend schwaches Wachstum (Spalte 2, 1:10 Verdünnung). Dies bedeutet, dass Ste50-3A das Wachstum auf hoch osmolarem Medium um einen Faktor 10 verschlechtert! Da hier das Wachstum bei 30°C nach 3 Tagen (SRG) und nach 5 Tagen (SRG + 1 M NaCl) gezeigt ist, ist der Einfluss von Ste50-3A auf den HOG-Signalweg also deutlich stärker als beim Pheromonantwortweg, wo lediglich die Adaption betroffen war.

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines Funktionstests für die RA-Domäne von Ste50

Wie in der Einleitung erwähnt, ist die Funktion von Ste50 für das Überleben der Zelle auf hoch osmolarem Medium essentiell, wenn der Parallelweg zu Pbs2 über Ssk1 unterbrochen ist. Zur Aufklärung der Funktion der RA-Domäne von Ste50 sollten Mutationen erzeugt werden, frühere Versuche zur Generierung zufälliger Mutationen in Ste50 resultierten aber immer in Mutationen im Bereich der SAM-Domäne. Da die RA-Domäne so stark variabel ist, konnte auch nicht auf gezielte Mutagenese ausgewichen werden. Also wurde eine Methode benötigt, mit der die Funktion der RA-Domäne ohne Gesamt-Ste50 überprüft werden kann. In unserer Arbeitsgruppe wurde früher bereits beobachtet, dass die gleichzeitige Expression des getrennten N- und C-Terminus von Ste50 den Paarungsdefekt einer Ste50-Deletion partiell wiederherstellt (Bühning & Ramezani-Rad, unveröffentlichte Ergebnisse). Dieses als „Trans-Komplementation“ benannte Phänomen wurde insbesondere für die Überprüfung der Funktion der RA-Domäne im Osmostress-Antwortweg verwendet.

Getestet wurde zunächst die gleichzeitige Expression von Ste50N (1-110) mit dem neu konstruierten Ste50-RA (215-346). In Flüssigmedium mit 0,4 M NaCl war Zellwachstum möglich, allerdings sehr viel schwächer als bei Ste50-Gesamtprotein (Daten nicht gezeigt). Diese Kombination war also nicht geeignet für einen Mutagenese-Screen.

Als nächstes wurde die Ko-Expression von Ste50N (1-252) mit der RA-Domäne (215-346) getestet (Abbildung 3.2). Die Osmo-Sensitivität eines W303-1A $\Delta ste50ssk1$ -Stammes wurde bei gleichzeitiger Expression von Ste50N (AS 1-252) und Ste50-RA (AS 215-346) teilweise komplementiert, das Wachstum eines Stammes mit Trans-Komplementation war auf festem Medium mit 0,4 und 0,7 M NaCl vergleichbar mit dem von Plasmid-exprimiertem WT-Ste50.

Über die Grundlagen für die Transkomplementation kann hier nur spekuliert werden. Möglicherweise findet die Transkomplementation aufgrund einer Assemblierung der Domänen an Gic1 statt, welches vielleicht auch *in vivo* die Interaktion von Ste50 mit Cdc42 vermittelt. Gic1 und Gic2 wurden von Drees *et al.* (2001) als Interaktionspartner von Ste50 in einem breit angelegten Two-Hybrid-Screen zur Aufklärung der in einer Zelle vorhandenen Protein-Komplexe ermittelt, es handelt sich bei den beiden Proteinen um Effektoren von Cdc42, die mitverantwortlich sind für die Etablierung der Zellpolarität.

Die Osmo-Sensitivität diente im Zusammenhang mit der Trans-Komplementation als Basis für die zufällige Mutagenese der RA-Domäne von Ste50. Die Mutagenese wurde von M. Sussmann in ihrer Diplomarbeit (2002) durchgeführt. Um mögliche Trans-Komplementations-Mutanten von RA-Interaktionsmutanten zu unterscheiden, mussten die Mutationen der RA-Domäne in Gesamt-Ste50 kloniert und hier noch einmal komplett charakterisiert werden. Drei Mutanten waren nicht in der Lage, auf Medium mit NaCl zu wachsen und hatten jeweils zwei



Abbildung 4.2 Kristallstruktur des Komplexes aus Ras und Ral-GDS₂ (Domänen)

Die interagierenden Seitenketten sind durch die blauen und roten Sphären markiert. Es handelt sich um eine Darstellung mit dem Programm PDB-Viewer (nach Huang *et al.*, 1998).

Programm PDB-Viewer. Die Interaktionsbereiche sind durch Markierung der beteiligten Seitenketten mit blauen und roten Sphären hervorgehoben. Es handelt sich um die erste Hälfte des ersten β -Faltblattes, den Loop zwischen den ersten beiden β -Faltblättern und um den Anfang des zweiten β -Faltblattes, bezogen auf die vorhergesagte und bestätigte Sekundärstruktur in Abbildung 4.1.

In einer weiteren Arbeit wurden spezifische Seitenketteninteraktionen aufgrund von Interaktions-Rekonstitutions-Mutanten und neuen Strukturen mit der gezeigten Struktur verknüpft oder bestätigt (Shirouzu *et al.*, 1999). Keine unserer zufälligen Mutanten liegt in diesem für die normale Interaktion zwischen RalGDS und RAS zuständigen Bereich der ersten beiden β -Faltblätter. Für die Interaktion zwischen der RA-Domäne von Raf mit Rap1A

wurden die ersten beiden β -Faltblätter mit dem Loop dazwischen sowie die zweite Hälfte der α -Helix als verantwortlich für die Interaktion identifiziert. Insbesondere die im Alignment mit den Pfeilen von unten markierten Raf-RBD-Seitenketten waren hier für die spezifische Interaktion zuständig (Nassar *et al.*, 1995).

Es hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass die Struktur für RAS-interagierende Domänen dieselbe ist, die Aminosäuresequenz und -spezifität, insbesondere der direkt involvierten Seitenketten, jedoch stark divergieren (Esser *et al.*, 1998). Je nach Superfamilie (Ras, Rho, Rab, Ran, Sar1/Arf) gibt es eigene Besonderheiten für die Interaktion zu beachten (Takai *et al.*, 2001). In Hefe sieht die Interaktionsfläche möglicherweise anders aus als in den Säuger-Strukturen. Hefen gehören bei einem größeren Alignment von eukaryontischen RAS-Interaktions-Domänen in eine eigene Untergruppe, die erst nach umfangreicher Änderung der Homologie-Bedingungen auftritt.

Da die erzielten Mutationen in der RA-Domäne von Ste50 nicht in den oben angesprochenen, definierten Interaktionsbereichen von RaIGDS/RAS oder Raf-RBD/Rap1A liegen und auch nicht getrennt vorliegen, können die Austausche nur allgemein besprochen werden. Der zweite Austausch in pMS12, L322S, betrifft das hochkonservierte Lysin im letzten β -Faltblatt, wo generell die stärkste Konservierung zu beobachten ist. Der Grund dafür ist nicht bekannt, allerdings wurde für Ste50 gezeigt, dass schon eine Deletion von 24 Aminosäuren am C-Terminus (Δ 323-346) einen Funktionsverlust bedingt (Wu *et al.*, 1999).

Bei der Definition der RA-Domäne wurde von Ponting und Benjamin (1996) nach einer Häufung von Knick-bildenden Glycinen und vielen kurzen β -Faltblattstrukturen für die Schaffung einer Interaktionsfläche gesucht. Die Austausche R296G (pMS8) und R283G (pMS12) betreffen jeweils die Umwandlung von Arginin in Glycin. R283 liegt am Beginn des ersten nach-Helix-Faltblattes, der Austausch in Glycin könnte hier besonders störend wirken. Generell ist ein solcher Austausch mit hoher Sicherheit Struktur-beeinflussend.

Die Umwandlung von Asparagin 301 in Serin (pMS8) bewirkt eine erhöhte Reaktivität, das Serin könnte möglicherweise unspezifisch phosphoryliert werden. Der Austausch von Prolin 318 in Leucin (pMS7) ist aus biochemischer Sicht wohl eher unbedeutend, genau wie der von Valin 286 zu Alanin (pMS7). Hier ist möglicherweise von einem sterischen Effekt mit größerer biologischer Bedeutung auszugehen, die Mutante pMS7 zeigt ja im Gegensatz zu pMS12 sogar eine Beeinträchtigung der Interaktion mit Gic1.

4.2 RA-abhängige Interaktionspartner von Ste50

Sowohl die RA-Mutanten als auch WT-Ste50 sowie Fragmente von Ste50 wurden im Two-Hybrid-Experiment auf Interaktion getestet. Dabei zeigte sich eine grundsätzliche Interaktion zwischen WT-Ste50 und Cdc42^{Val12} sowie Ste50 und Gic1. Der Kontakt von Ste50 mit Gic1 und Gic2 wurde bereits 2001 in einer systematischen Two-Hybrid-Analyse nachgewiesen (Drees *et al.*, 2001). Gic1 und Gic2 sind Effektoren von Cdc42, welche genau wie auch Cdc42 stark in alle Polarisierungsprozesse involviert sind. Die Interaktion zwischen Gic1 und Ste50 findet über die RA-Domäne bzw. den C-Terminus statt (Abbildung 3.6). Der überlappende Bereich (215-252) zwischen N-Terminus (1-252, Ste50N) und RA (215-346) scheint für eine messbare Interaktion nicht ausreichend zu sein, Ste50N alleine zeigt keine Interaktion. RA alleine interagiert sehr stark mit Gic1.

Die Two-Hybrid-Interaktion zwischen Ste50 und Cdc42^{Val12} wurde bereits von Frauke Bühring gezeigt (unveröffentlichte Daten) und hier verifiziert (Abbildung 3.6 1-4). In dieser Arbeit wurde speziell die Interaktion der neu erhaltenen RAD-Mutanten mit Cdc42^{Val12} durch Two-Hybrid-Untersuchung überprüft. Alle Mutanten zeigen eine gestörte Interaktion, nur bei Ste50-RA-2 ist noch eine schwächere Interaktion zu beobachten. Da Ste50-RA-2 in den anderen Untersuchungen (HOG, Shmoo/G1-Arrest, *FUS1-lacZ*) keine signifikante Signalantwort hervorrufen konnte, sind zwei Erklärungen denkbar:

1. Die Interaktion von Ste50 und Cdc42 ist nicht von Bedeutung für den Paarungspheromon-Signal-Antwortweg oder für die Anpassung an hochosmolare Bedingungen.
2. Die Interaktion von Ste50-RA-2 mit Cdc42 ist so stark geschwächt, dass die Signalweiterleitung bei den untersuchten Bedingungen nicht möglich ist. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die gezeigte Interaktion zwischen Ste50-RA-2 und Cdc42^{Val12} viel schwächer ist als die von WT-Ste50. Ein Grund für die Bevorzugung dieser Interpretation ist die Tatsache, dass bereits bei der erstmaligen Charakterisierung von Ste50 gezeigt wurde, dass der Signalweg für die Vorbereitung der Paarung bei einer Deletion von Ste50 grundsätzlich intakt ist, aber die Signalstärke nicht mehr ausreicht, um alle Antworten normal zu induzieren (Jansen, Dissertation 1998).

Ste50-RA-2 zeigt in der Pheromon-abhängigen *FUS1*-Aktivierung eine geringfügig höhere Reporter-Aktivität als die beiden anderen RA-Mutanten. Insofern scheint die Interaktion der Ste50-Ra-Domäne mit Cdc42 für die Pheromon-Antwort entscheidend zu sein, nicht die Interaktion mit Gic1.

Die RA-Mutanten Ste50-RA-48 und Ste50-RA-64 zeigen keine Interaktion mit Cdc42^{Val12}, jedoch eine schwache Interaktion mit Gic1. Dies ist bedeutsam, da die Interaktion von Gic1 und Ste50 aufgrund der gezeigten Ergebnisse auf den C-Terminus eingegrenzt werden konnte, vermutlich auf die Region zwischen AS 252 und 346. Die Mutante Ste50-RA-48 besitzt jedoch ein verfrühtes Stop-Kodon an Position 223. Möglicherweise liegt die schwache Bindung zu Gic1 hier an einer im Immunoblot nicht zu detektierenden Restmenge an Vollängen-Ste50 (mit weiteren Austausch-Mutationen) aufgrund einer am verfrühten Stop-Kodon teilweise fortgesetzten Translation, ein Terminator ist hier ja nicht gegeben! Die andere und wahrscheinlichere Möglichkeit ist der unterschiedlich starke Einfluss der Fusion am N- oder C-Terminus auf die Interaktionsstärke.

Die Interaktion von Ste50-RA-48 mit Gic1, nicht jedoch mit Cdc42, deutet auf unterschiedliche Regionen für die Interaktion von Ste50 mit Gic1 und Cdc42 am C-Terminus von Ste50 hin. Auch scheint die Rest-Interaktion mit Gic1 keinen detektierbaren Einfluss auf die *FUS1-lacZ*-Induktion, Shmoo-Bildung und G1-Arrest nach Zugabe von α -Faktor oder auf die Osmo-Sensitivität zu haben.

Die Interaktion mit Gic1 ist sehr viel stärker ausgeprägt, wenn statt Gesamt-Ste50 nur der C-Terminus verwendet wird, was die Frage nach einer negativen Wirkung des Ste50-N-Terminus bzw. der N-terminal vermittelten Bindung zu Ste11 auf die RA-Interaktion aufwirft. Diese Interpretation wird durch die Tatsache unterstützt, dass Ste50-4 (Mutante in der SAM-Domäne, welche nur sehr schwach mit Ste11 interagiert; Jansen *et al.*, 2001) besser mit Cdc42^{Val12} interagiert als WT-Ste50.

Bei allen geäußerten Interpretationen sind die Kernlokalisierung der Proteine bei Two-Hybrid-Messungen und die veränderten Expressionsbedingungen in Betracht zu ziehen, sie bedürfen daher zusätzlicher Untersuchungen.

4.3 Die Modifizierung von Ste50

Ein Immunoblot von chromosomal integriertem *STE50* mit nativem Promotor und Myc-Tag zeigt, dass Ste50 bei Induktion der verschiedenen Signaltransduktionswege (Zugabe von α -Faktor, Salz oder Entzug von Stickstoff) modifiziert wird (Abbildung 4.3; Hopp & Ramezani-Rad, persönliche Mitteilung), zu erkennen an der Verschiebung der Bande zu höherem Molekulargewicht. Je nach Signaltransduktionsweg ist die Modifizierung dabei unterschiedlich, am deutlichsten ist sie bei der Induktion mit α -Faktor zu sehen.

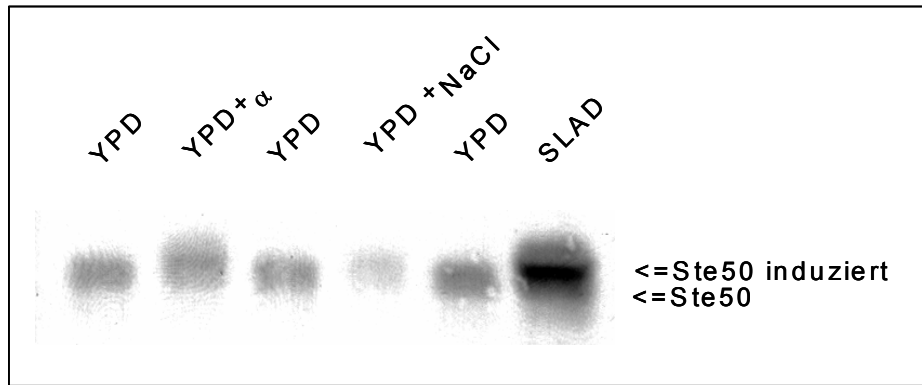


Abbildung 4.3 Bei Induktion der drei Signaltransduktionswegen wird Ste50 posttranslational modifiziert

Dargestellt ist ein Immunoblot mit Antikörpern gegen das verwendete Myc-Epitop. Rohextrakte wurden aus nicht-induzierten und induzierten Zellen gewonnen, welche chromosomal integriertes Myc-Ste50 unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimieren. Hopp, persönliche Mitteilung.

Die Überexpression von GST-Ste50 führt bei Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel zu zwei Banden, von denen die obere nach Behandlung mit Phosphatase (CIP) verschwindet. Nach 4h Inkubation bei 37°C ohne CIP ist lediglich die obere Bande zu sehen, die untere hingegen nicht mehr. Wildtyp Myc-Ste50 zeigte ohne Aktivierung der Signalwege hingegen nur eine Bande.

Aus der Tatsache, dass die obere Bande für GST-Ste50 bei Phosphatase-Behandlung verschwindet, kann man auf eine Phosphorylierung von Ste50 schließen. Diese Phosphorylierung ist unabhängig von einer Induktion der Signaltransduktionswege.

Die Protein-Überexpression oder die Dimerisierung aufgrund der GST-Fusion könnten möglicherweise diese Phosphorylierung auslösen. Wang & Elion haben 2003 gezeigt, dass eine GST-Fusion von Ste5 dessen Funktion durch veränderte Komplexzusammensetzung verändert und aktiver ist, während Grimshaw *et al.* 2003 nachwies, dass Ste50 und Ste11 unter normalen Bedingungen einen trimeren Komplex aus Ste11₂Ste50 bilden.

Die verantwortliche Kinase für die durch Phosphatase-Behandlung gezeigte Phosphorylierung von Ste50 kann nicht Ste11 sein, da Ste11 im betreffenden Stamm deletiert war. Das Fehlen der unteren Bande nach 4h Inkubation bei 37°C und das Vorhandensein der oberen Bande lassen im Vergleich zur unbehandelten Probe in Spur 1 die Folgerung zu, dass das Auftreten von zwei Banden bei Überexpression auf einer unvollständigen Grund-Phosphorylierung beruht. Im Umkehrschluss führt dies zur Aussage, dass Ste50 unter nativen Bedingungen (chromosomal integriert mit eigenem Promotor) konstitutiv phosphoryliert ist. Diese Schlussfolgerung wird gestützt durch die Tatsache, dass erst kürzlich (Oktober 2003) eine konstitutive Phosphorylierung von Ste50-T42 (GST-gekoppelt) durch Casein-Kinase I gezeigt werden konnte (Wu *et al.*, 2003).

4.4 GST-Ste50 wird bei Induktion des Pheromonantwortweges vermehrt phosphoryliert

Untersuchungen zur Phosphorylierung von Ste50 auf einen möglichen Zusammenhang mit der Induktion des Paarungspheromonantwortweges wurden durchgeführt. Einerseits wurde nach Serin-Phosphorylierung gesucht, andererseits nach einer allgemeinen Phosphorylierung von Ste50 zu verschiedenen Zeiten nach der Induktion. Der Phosphoserin-Antikörper hat die GST-Ste50-Bande zu allen vier Zeitpunkten erkannt, bei 0 und 70 min besonders stark. Dies zeigte, dass GST-Ste50 immer auch eine Serin-Phosphorylierung trägt. Paarungspheromon scheint dies zu verstärken. Auch die Anfärbung mit dem Phosphoprotein-Floureszenzfarbstoff ProQ-Diamond zeigte eine durchgehende Phosphorylierung von GST-Ste50 an, verstärkt bei 0 und 70 min. Im Gegensatz zur Phosphoserin-Detektion ist hier jedoch die Verstärkung vor allem über der GST-Ste50-Bande zu sehen; der erkannte Bereich ist so groß, dass von mehreren Phosphorylierungen ausgegangen werden muss.

Daraus resultiert unterstützend zur Phosphatase-Wirkung zwingend der Schluss, dass unter den getesteten Bedingungen die Ste50-Grundbande konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Bei der konstitutiven Phosphorylierung muss folglich auch ein Serin-Rest betroffen sein. Ob es weitere konstitutive Phosphorylierung gibt, kann durch dieses Experiment nicht geklärt werden. Die Induktion des Paarungsweges durch α -Faktor führt nach 70 min zu einem vermehrten Auftreten von phosphorylierten Banden höheren Molekulargewichtes, allerdings sind solche Banden auch ohne α -Faktor zu erkennen, bei 40 und 120 min jedoch nicht. Bei dieser zusätzlichen Phosphorylierung scheint es sich nur teilweise um Serin-Reste zu handeln, wie aus dem Vergleich mit dem Phosphoserin-Immunoblot deutlich wird. Bei 0 und 70 min kommt es zwar zu einem verstärkten Signal auf Höhe von GST-Ste50, allerdings nicht bei erhöhtem Molekulargewicht!

Ein generelles Problem für die Beurteilung, ob es eine α -Faktor-abhängige (-induzierte) Phosphorylierung gibt, ist die Unterschiedlichkeit der Bedingungen. Für überexprimiertes GST-Ste50 konnte bei Einsatz von 2 mg Protein aus 6 l Kultur eine sehr schwache α -Faktor-induzierte Bande im Coomassie-Gel detektiert werden (für die Massenspektroskopie). Obwohl durch die Massenspektroskopie für diese induzierte Bande eine Phosphorylierung gezeigt wurde, ist in geringeren Mengen auch in den anderen untersuchten Proben aus nicht-induzierten Banden eine solche Phosphorylierung feststellbar. Setzt man deutlich weniger Protein ein, oder verwendet den schwachen *STE50*-Promotor, bekommt man diese Bande auch ohne α -Faktor-Induktion, aber dennoch nicht konstitutiv (siehe oben). Nur in Abbildung 3.16 konnte ein α -Faktor-abhängiger „band shift“ für GST-Ste50 bei Verwendung des eigenen Promotors gezeigt werden, dieser ist allerdings aufgrund der geringen Protein-

Menge nicht immer eindeutig zu identifizieren! Lediglich bei chromosomal integriertem myc-*STE50* mit eigenem Promotor ist sonst noch eine α -Faktor-abhängige Modifikation von Ste50 zu beobachten (siehe Abbildung 4.3), hier ist dann allerdings ein größerer Anteil der Ste50-Gesamt-Protein-Menge betroffen. Sowohl der Fusionspartner (GST oder myc) als auch die Protein-Menge (Promotor) scheinen also einen Einfluß auszuüben.

Das andere grundsätzliche Problem liegt in der Tatsache, daß Ste50 mehrfach phosphoryliert wird und eine Unterscheidung der verschiedenen Phosphorylierungen nicht bei allen Methoden möglich ist. Es gibt außer der in dieser Arbeit nachgewiesenen Phosphorylierung von Ste50-S196 und Ste50-S198 eine weitere Phosphorylierung von Ste50-T42 durch Casein-Kinase I (Wu *et al.*, 2003). In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass es sehr viele phosphorylierte Fragmente für GST-Ste50 nach Trypsin-Verdau gibt, die Zugabe von α -Faktor ergab dort in einem 2D-Gel nur geringe Unterschiede. Alle anderen Hinweise auf Phosphorylierung von Ste50 sind bestenfalls eine Eingrenzung der Region (Ste11 phosphoryliert SAM-Domäne von Ste50 *in vitro*; Wu *et al.*, 1998) oder der betroffenen Aminosäure-Klasse (Serin/ nicht Serin; Vergleich Phosphoserin-Antikörper mit Phosphostain in dieser Arbeit), oder es kann nur eine allgemeine Aussage getroffen werden (Phosphatase-Wirkung), die durch die gezeigte konstitutive Phosphorylierung von Ste50 relativiert wird. Die Aussage, dass Ste50 durch α -Faktor vermehrt phosphoryliert wird, ist abgeleitet aus der Tatsache, dass Ste50-3A vermutlich einen Phosphorylierungsdefekt hat (Austausche von nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen) und in Abbildung 3.16 keinen α -Faktor-abhängigen Shift mehr zeigt, kombiniert mit dem Ergebnis von Phosphoprotein-Färbung und Phosphoserin-Detektion, dass Ste50 70 min nach α -Faktor-Induktion deutlich stärker phosphoryliert wird, als bei 40 und 120 min.

4.5 Massenspektroskopische Analyse von Ste50

GST-Ste50 wurde überexprimiert und aus mit α -Faktor inkubierten Zellen aufgereinigt. Im Coomassie-Gel trat eine zusätzliche schwache Bande über dem Hauptprodukt auf. Mehrere Spots aus der induzierten und der breiten Hauptbande wurden massenspektroskopisch untersucht. Trypsin-Verdau zeigte keine Modifizierung, Chymotrypsin-Verdau führte zur Entdeckung von zwei Massen, welche durch die ein- und zweifache Phosphorylierung eines Spaltpeptids (AS 189-207) erklärt werden können. Im zugehörigen Peptid sind außer den drei Serin-Resten S196, S198 und S202 auch zwei Threonine vorhanden. Da bei Trypsin-Verdau zum Spaltpeptid mit den AS 201-220 kein zugehöriges phosphoryliertes Peptid entdeckt wurde, kann man S202 ausschließen. Wenn man den Einfluss der Austauschmutante Ste50-3A bedenkt, kann man auf eine Phosphorylierung der Serine S196 und S198 schließen. Eine Unterscheidung zwischen S196 oder S198 für die einfache Phosphorylierung ist nicht möglich. Die phosphorylierten und unphosphorylierten

Spaltpeptide zeigten sich auch in den anderen Spots, jedoch unterschieden sich die Intensitäten (siehe Tabelle 3.2, Abbildungen 3.13 A-D und 3.14).

Analysiert man das Verhältnis der phosphorylierten Peptide zum unphosphorylierten, zeigt sich ein zweistufiger Prozess: Es scheint eine Grundphosphorylierung an S196 oder S198 zu geben, die P_1 -Anteile ändern sich im Verlauf der Ste50-Grundbande (Spots 1-3) kaum. Der Anteil von P_2 steigt jedoch bei höherem Molekulargewicht stark an. Ein Hinweis auf eine Grundphosphorylierung zeigt sich auch im veränderten Laufverhalten von nicht-induziertem Protein von WT-Ste50 und der Ste50-3A-Mutante (Abbildung 3.16 A+B). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Kontrolle bei der Auswirkung von alkalischer Phosphatase auf GST-Ste50 (Abbildung 3.9), bei der die untere Bande für GST-Ste50 nach 4h Inkubation bei 37°C verschwindet, was eine fortgesetzte Phosphorylierung des überproduzierten Ste50 nahelegt. Die untere Bande wäre demnach „unreifes“ unphosphoryliertes Protein, welches im Normalfall ohne Überexpression gänzlich phosphoryliert wäre. Dieses Grundniveau wird bei Signalweiterleitung um mindestens eine weitere Phosphorylierung verstärkt, wohl auch bei S196 oder S198. Die Tatsache, dass in der α -Faktor-induzierten Bande (Abbildung 3.12 Spot 4) besonders viel P_2 -Spaltpeptid vorliegt, erlaubt die Vermutung einer α -Faktor-abhängigen Phosphorylierung an S196 und/oder S198.

Die unscharfe Verteilung der phosphorylierten Spaltpeptide ist vermutlich durch die Überladung und daraus resultierende unvollständige Auftrennung zu erklären.

Die Unterscheidung zwischen S196 und S198 bei einfacher Phosphorylierung ist nicht möglich, da die Intensitäten für MS/MS nicht ausreichten. Bei einer solchen direkten Nachbarschaft ist allerdings eine wechselseitig ersetzbare Phosphorylierung zu vermuten, wie sie bereits in anderen Fällen gezeigt wurde (u.a. Görner *et al.*, 2002).

4.6 Potentielle Phosphorylierungsstellen in Ste50

Zur Unterscheidung der verschiedenen Phosphorylierungsereignisse wurde nach möglichen Phosphorylierungsresten in Ste50 gesucht (GST wird nicht phosphoryliert, von Drogen *et al.*, 2000). Ste50 besitzt 36 Serin-Reste, 22 Threonin-Reste und 5 Tyrosin-Reste. Serin und Threonin treten gehäuft in der dementsprechend benannten Serin/Threonin-reichen Region in der Mitte von Ste50 auf, für die noch keine Funktion beschrieben werden konnte. Mit Programmen wie Netphos 2.0 und anderen im Internet zur Verfügung stehenden Programmen wurde nach potentiellen Phosphorylierungsstellen gesucht. Der Großteil der Ergebnisse wurde mit dem Hinweis versehen, häufig nicht zuzutreffen (insbesondere Casein-Kinase I+II), andere Positionen traten bei den verschiedensten Programmen als sehr wahrscheinlich auf. Diese Ergebnisse wurden mit einer manuellen Suche nach cAMP-abhängigen Konsensus-Sequenzen (gesucht wurde R/k R/k x S/T und R/k x x S/T x K/R/H) kombiniert und führte zur Auswahl von 7 potentiellen Phosphorylierungsstellen. Die einzige

perfekt zur Konsensussequenz passende Position S202 (RReSpvT) befand sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den von den verschiedenen Programmen ebenfalls gehäuft erkannten potentiellen Phosphorylierungsstellen S196 und S198. Diese Region wurde daher als Hotspot eingestuft und eine Mutante mit dem gleichzeitigen Austausch aller drei Serine gegen Alanin erzeugt (Ste50-3A), da bei nah aneinander liegenden Phosphorylierungsstellen häufig nur ein Austausch aller Stellen Auswirkungen zeigt (u.a. Görner *et al.*, 2002). Die anderen konstruierten Austausche sind im Ergebnisteil angeführt (3.6; S127A, S202A, S202E, S211A, S259A). Die oben genannten Ergebnisse der Massenspektroskopie lagen zum Zeitpunkt der Mutanten-Generierung noch nicht vor und konnten daher auch nicht berücksichtigt werden.

Alle Mutanten wurden charakterisiert in Bezug auf die Funktion der Signaltransduktionwege für Paarung und Osmostress. Einzig die Austauschvariante Ste50-3A zeigte einen Phänotyp, Ste50-3A reagiert genauso schnell und stark auf α -Faktor wie WT-Ste50, wenn man die Induktion des *FUS1*-Promotors (bis 200 min) betrachtet. Nach Erreichen eines maximalen Plateaus sinkt die β -Galaktosidase-Aktivität bei Ste50-3A jedoch wieder schnell ab, bei WT-Ste50 wird auf dem Plateau verharrt (200-300 min). Auch bei den morphologischen Veränderungen ist ein Phänotyp zu beobachten. Der G1-Arrest setzt für Zellen mit Ste50-3A wieder genauso schnell ein wie bei WT-Ste50, allerdings erholt sich die Mutante schneller (150-300 min: 10-20% teilende Zellen bei 3A, 0-3% für WT). Lediglich bei der Ausbildung von Paarungsfortsätzen (Shmoos) ist für Ste50-3A auch in der direkten Antwort ein Defekt zu erkennen! Bis zu 100 min nach Pheromon-Zugabe ist die Ausbildung von Paarungsfortsätzen bei Ste50-3A ebenso schnell gestiegen wie bei WT-Ste50. Dann jedoch verharrt der Anteil an Shmoos-Zellen bei 40% für die nächsten 100 min und fällt anschließend schon wieder ab, während der Wert für WT-Ste50 auf 80-90% steigt und dort verharrt. Da nach dem G1-Arrest im Normalfall der Paarungsfortsatz gebildet wird und erst nach längerem Warten eine Adaptation auftritt, kann man diese Ergebnisse dahingehend interpretieren, dass bei Ste50-3A der G1-Arrest genauso schnell eingeleitet wird wie bei WT-Ste50, es aber schneller wieder zu einer Aufhebung des G1-Arrestes und damit zur weiteren Teilung kommt (siehe Budding-Index). Daher akkumulieren hier die Shmoos-Zellen nicht so stark wie bei WT-Ste50, wo der G1-Arrest bis zum Ende der Messzeit (300 min) nicht aufgehoben wurde.

Die Expression von *GALp-GST-STE50-3A* im Stamm W3031A $\Delta ste50 \Delta ssk1$ führte zur Entdeckung eines weiteren Defektes: Die Zellen können bei 1 M NaCl um eine Größenordnung schlechter wachsen als Zellen mit WT-Ste50. Hier wird nicht die direkte Antwort auf Osmostress, sondern die Anpassung an diesen nachgewiesen, die Platten mit den Verdünnungen werden 3-5 Tage bei 30°C inkubiert und erst bei gut sichtbaren Kolonien

ausgewertet. Die Frage, ob sich Ste50-3A also in der direkten Antwort auf Osmostress auch wie WT-Ste50 verhält und wieder nur einen Defekt in der Aufrechterhaltung des Signals besitzt, kann daher nicht beantwortet werden.

Für den HOG-Signalweg konnte gezeigt werden, dass die initiale Reaktion des Weges auf Salz-Zugabe in Wildtyp-Zellen bereits nach einer Minute zu phosphoryliertem Hog1 führt. Es wird diskutiert, ob es hier verschiedene Wege für Sofortmaßnahmen und langfristige Anpassung gibt (Hohmann 2002; O'Rourke & Herskowitz, 2003). Zudem wird eine abgestufte Antwort je nach Osmolaritäts-Stärke vorgeschlagen: Bei starker Osmolarität ist neben den beiden bekannten Verzweigungen des HOG-Weges noch eine weitere Hog1-abhängige Antwort vorhanden, zusätzlich dazu ist auch der generelle Stressantwortweg aktiv (O'Rourke & Herskowitz, 2003).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass Ste50-3A unter den untersuchten Bedingungen in der initialen Signalantwort funktioniert, bei der Aufrechterhaltung der Antwort jedoch defizient ist. Eine Deletion von Ste50 verhält sich prinzipiell ähnlich, Überexpression anderer Proteine des Signaltransduktionsweges oder hyperaktive Mutanten (z.B. Ste11-1; Wu *et al.*, 1999) können den Deletionseffekt von Ste50 teilweise aufheben und die Signalantwort ermöglichen. Die Wirkung von Ste50 ist also in der Verstärkung und Aufrechterhaltung des Signals zu suchen, die Deletion unterbricht den Weg nicht, sondern senkt die Signalstärke unter ein Mindest-Level. Die RA-Mutanten verhalten sich wie eine Deletion von Ste50. Ste50-3A hingegen zeigt, dass die Wirkung von Ste50 auf die Signaltransduktionswege zeitlich differenziert zu betrachten ist, unterschieden nach schneller Initialantwort und langfristiger Anpassung/Aufrechterhaltung sowie Aufhebung des Signals.

Die Mutante Ste50-3A zeigt in Immunoblots unabhängig von einer Induktion durch α -Faktor ein etwas schnelleres Laufverhalten als WT-Ste50. Dies unterstützt die Vermutung einer konstitutiven Phosphorylierung und lässt eine Zuordnung zu den ausgetauschten Serin-Resten S196, S198 und/oder S202 zu. Außerdem zeigten sich Hinweise auf eine Protein-Stabilisierung von Ste50-3A. WT-Ste50 zeigt dagegen Instabilität nach Induktion mit α -Faktor.

Die Generierung der Ste50-3A-Mutante war ein glücklicher Zufall unterstützt durch den „richtigen Riecher“. Da die Austausch-Mutanten S202A und S202E keinen Phänotyp zeigten, ist die Zuordnung der Phosphorylierung für S196 und S198 aus der Massenspektroskopie zusätzlich bestätigt. Vermutlich ist eine cAMP-abhängige Kinase für diese Phosphorylierung zuständig, da die Auswahl unter anderem durch die Suche nach cAMP-abhängigen Konsensus-Sequenzen getroffen wurde. Casein-Kinase I dürfte es wegen der Sequenz nicht

sein, obwohl hierfür die Phosphorylierung von GST-Ste50-T42 gezeigt wurde (Wu *et al.*, 2003).

Bereits 1998 konnten Wu *et al.* in einem Kinase-Assay zeigen, dass Ste11 Ste50 *in vitro* phosphoryliert. Ohne die N-terminale Interaktionsdomäne SAM von Ste50 oder Ste11 findet diese Phosphorylierung nicht statt. Die Deletion der internen Ser/Thr-reichen Region von Ste50 (131-218 inklusive) hatte hier keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Ste50 durch Ste11, was Ste11 als verantwortliche Kinase für die Phosphorylierung von S196 und S198 ausschließt! Es wurde spekuliert, dass die Bindung von Ste50 an Ste11 die Autophosphorylierung von Ste11 verhindert und darüber die Wirkung von Ste50 vermittelt wird. Dies kann als alleiniger Mechanismus ausgeschlossen werden, da die Grundphosphorylierung in einem $\Delta ste11$ -Stammhintergrund nachgewiesen werden konnte und in der Ste50-3A-Mutante ein Phänotyp zu beobachten ist, obwohl es keine Hinweise auf eine gestörte Interaktion mit Ste11 gibt.

Für die SAM-Domäne von Ste50 wurde eine Kristallstruktur veröffentlicht, sowohl alleine als auch im Komplex und mit Mutationen in der SAM-Domäne, welche eine Heterodimerisierung verhindern (Grimshaw *et al.*, 2003). Als biologisch wirksamer Komplex aus Ste11 und Ste50 wird ein Trimer mit zwei Molekülen Ste11 und einem Molekül Ste50 vorgeschlagen. Dies unterstützt die Vermutung, dass eine verminderte Bindung zwischen Ste11 und Ste50 die Bindung über die RA-Domäne verstärkt oder ermöglicht, da eine sterische Hinderung angenommen werden kann. Die bisherige Annahme, dass Ste11 und Ste50 konstitutiv aneinander binden (Wu *et al.*, 1999), wird hierdurch ebenfalls relativiert: Eine Reduzierung von zwei Ste11-Molekülen auf ein einziges für den Komplex aus Ste50 und Ste11 wäre bei den dort gezeigten Experimenten zur konstitutiven Bindung ohne Einfluss geblieben! Eine solche Änderung der Komplexzusammensetzung durch die verschiedenen Signalwege erscheint also möglich.

Kürzlich konnte von einer anderen Gruppe gezeigt werden, dass Ste50 N- und C-terminal mehrfach phosphoryliert wird: In einem 2-D-Gel wurden nach Trypsin-Verdau mindestens fünf phosphorylierte Fragmente beobachtet, Zugabe von α -Faktor zeigte hier nur geringe Veränderungen (Wu *et al.*, Oktober 2003). Im N-Terminus wurde Threonin 42 als Ziel für Casein Kinase I identifiziert, bei einem Austausch in Alanin konnte der Paarungspheromonantwortweg schwach induziert werden, der HOG-Pathway war jedoch nicht betroffen. Eine aktive Mutante, T42D, verhielt sich wie WT-Ste50. Daraus ist zu schließen, dass die Phosphorylierung von Threonin42 ein notwendiger, aber nicht

ausreichender Prozess für die Funktion von Ste50 ist, und es sich hierbei also um eine weitere Grundphosphorylierung handelt.

Im Gegensatz zu T42A zeigte die Ste50-3A-Austauschmutante einen Phänotyp sowohl in der Antwort auf hoch osmolare Bedingungen (HOG) als auch im Pheromonantwortweg, jedoch war der Defekt hier auf die Aufrechterhaltung des Signals beschränkt, nicht auf die Einleitung/Weiterleitung. Dies unterstützt die Vermutung, dass Ste50 je nach involviertem Signaltransduktionsweg anders modifiziert wird, was auch aus der unterschiedlich starken Verzögerung von Ste50 nach Induktion der drei Wege deutlich wird. Es steht zu vermuten, dass Ste50 durch die vielen verschiedenen Phosphorylierungen nicht nur direkt in seiner Funktionalität beeinflusst wird, sondern dass es teilweise auf dem Umweg über die Proteinstabilität und den verstärkten Abbau auch zu einer zeitlich differenzierten Funktionsänderung von Ste50 kommt, das heißt Ste50 hat je nach Phosphorylierungszustand und Zeitpunkt eine andere Funktion im Signaltransduktionsweg.

5 Zusammenfassung

Wie externe Signale von der eukaryotischen Zelle weiterverarbeitet werden, ist eine der zentralen Fragestellungen der Molekularbiologie. Das hier untersuchte Signalmolekül Ste50 ist eine essentielle Komponente innerhalb der Signalübertragungswege für Paarung, Osmoregulation und filamentöses Wachstum in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diese Signalwege verbinden einen Rezeptor-G-Protein-Komplex über einen mitogen-aktivierten-Proteinkinase(MAPK)-Komplex mit spezifischen Transkriptionsfaktoren. Ste50 beteiligt sich an der Regulierung der eingegangenen Signale zwischen dem aktiven G-Protein und dem MAP-Kinase-Modul. Dabei steht Ste50 in strukturellem und funktionellem Zusammenhang mit den G-Proteinen durch die postulierte C-terminale Ras-Assoziierungs-Domäne (RA) und mit der Kinase Ste11 über die N-terminale SAM-Domäne (sterile alpha motif). Beide Domänen, RA und SAM, sind für die Funktion von Ste50 essentiell.

Die Funktion der RA-Domäne und der mittleren Ser/Thr-reichen Region von Ste50 wurde in dieser Arbeit näher charakterisiert, insbesondere auch die Phosphorylierung von GST-Ste50. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit ein neues Screening-Verfahren für die Suche nach Mutationen in der RA-Domäne von Ste50 auf der Basis der gezeigten Trans-Komplementation etabliert, was zur Charakterisierung neuer RA-Mutanten führte, die sich wie Ste50-Deletionen verhalten. Im Two-Hybrid-Test zeigten die neuen Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Ste50 ein verändertes Interaktionsverhalten mit dem G-Protein Cdc42 und seinem Effektor Gic1. Die Bindung der Ste50-RA-Mutanten mit hyperaktivem Cdc42^{Val12} war schwächer als die von Wildtyp-Ste50 oder ganz abwesend, die Interaktion mit Gic1 war in drei Fällen nicht mehr nachweisbar. Die Wechselwirkung von Ste50 und Gic1 konnte auf die RA-Region, Aminosäuren 252-346, eingegrenzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde nachgewiesen, dass Ste50 mehrfach phosphoryliert wird. Massenspektroskopische Untersuchungen nach Aufreinigung großer Mengen an GST-Ste50 konnten die Phosphorylierung von Serin 196 und Serin 198 zeigen, der mittleren Serin/threonin-reichen Region von Ste50. Sowohl ein- als auch zweifache Phosphorylierung des Peptids 189-207 wurde nachgewiesen. Die Phosphorylierung steht im Zusammenhang mit der Induktion durch α -Pheromon. Es gibt eine α -Pheromon-abhängige und eine konstitutive Phosphorylierung, die beide in der Ste50-3A-Austauschmutante (S196A S198A S202A) verändert vorlagen. Diese Austauschvariante zeigte Anzeichen einer erhöhten Proteinstabilität. Im Pheromonantwortweg wies Ste50-3A einen Defekt in der Aufrechterhaltung der pheromon-induzierten Signaltransduktion auf, während die Mutante im High Osmolarity Glycerol (HOG)-Weg zur Anpassung an hochosmolare Bedingungen eine erhöhte Osmo-Sensitivität (10x) zeigte.

6 Literatur

Aitken A (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol* **6**: 341-347

Albertyn JM, Hofmann S, Thevelein JM, Prior BA (1994) GPD1 which encodes glycerol-3-phosphatdehydrogenase, is essentiell for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**: 4135-4144

Alexander M, Perret M, Gustin MC (1998) MAP kinases pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Mol Biol Rev* 1264-1300

Amersham pharmacia biotech (1997) GST, Gene fusion system. 3rd ed., Rev. 2

Barr MM, Tu H, Aelet Lv, Wigler M (1996) Identification of Ste4 as a potential regulator of Byr2 in the sexual response pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **16(10)**: 5597-5603

Bhattacharya S, Chen L, Broach JR, Powers S (1995) Ras membrane targeting is essential for glucose signaling but not for viability in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 2984-2988

Blum *et al.*, (1987) *Electrophoresis* **8**: 93-99

Boguslawski G & Polazzi JO (1987) Complete nucleotide sequence of a gene conferring polymyxin B resistance on yeast: similarity of the predicted polypeptide to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci* **84(16)**: 5848-52

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259(5102)**: 1760-3

Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR (1999) Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44(MAPK)-dependent phosphorylation. *Science* **286**: 2514-2517

Cairns BR, Ramer SW, Kornberg RD (1992) Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. *Genes Dev* **6(7)**:1305-18

Choi KY, Satterberg B, Lyons DM, Elion EA (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**:499-512

Clapham DE & Neer EJ (1993) New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. *Nature* **365**: 403-406

Cohen P (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem Sci* **17(10)**:408-13

Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* **25(12)**:596-601

Cook JG, Bardwell L, Thorner J (1997) Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**: 85-88

Cooper JA (1994) MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr Biol* **4**: 1118:1121

Courchesne WE, Kunisawa R, Thorner J (1989) A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycle in *S. cerevisiae*. *Cell* **58**: 1107-1119

Crechet JB, Jacquet E, Bernardi A, Parmeggiani A (2000) Analysis of the role of the hypervariable region of yeast Ras2p and its farnesylation in the interaction with exchange factors and adenyl cyclase. *J Biol Chem* **275**, 17754-17761

Cullen PJ, Schultz J, Horecka J, Stevenson BJ, Jigami Y, Sprague GF Jr (2000) Defects in protein glycosylation cause *SHO1*-dependent activation of a *STE12* signaling pathway in yeast. *Gen* **155**: 1005-1018

Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [Review]. *Cell* **103**, 239-252

DeMattei CR, Davis CP, Konopka JB (2000) Point mutations identify a conserved region of the *Saccharomyces cerevisiae* *AFR1* gene is essential for both the pheromone signalling and morphogenesis functions. *Genetics* **155**: 43-55

Di Paolo G, Antonsson B, Kassel D, Riederer BM, Grenningloh G (1997) Phosphorylation Regulates the Microtubule-Destabilizing Activity of Stathmin and Its Interaction with Tubulin. *FEBS Letters* **416**, 149-152

Dohmen RJ, Strasser AWM, Höner CB, Hollenberg CP (1991). An Efficient Transformation Procedure Enabling Longterm Storage of Competent Cells of Various Yeast Genera. *Yeast* **7**: 691-692

Drees BL, Sundin B, Brazeau E, Caviston JP, Chen G-C, Guo W, Kozminski KG, Lau ML, Moskow JJ, Tong A, Schenkman LR, McKenzie III A, Brennwald P, Longtime M, Bi E, Chan C, Novick P, Boone C, Pringle JR, Davis TN, Fields S, Drees DG (2001) A protein interaction map for cell polarity development. *Mol Cell Biol* **154**: 549-571

Drogen F van & Peter M (2002) MAP kinase cascades: scaffolding signal specificity. *Curr Biol* **12**:R53-R55

Drogen F, O'Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM, Peter M (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr Biol* **10**: 630-639

Drysdale CM, Duenas E, Jackson BM, Reusser U, Braus GH, Hinnebusch AG (1995) The Transcriptional Activator GCN4 Contains Multiple Activation Domains That Are Critically Dependent on Hydrophobic Amino Acids. *Mol Cell Biol* **15**(3):1220-1233

Drysdale CM, Jackson BM, McVeigh R, Klebanow ER, Bai Y, Kokubo T, Swanson M, Nakatani Y, Weil PA, Hinnebusch AG (1997) The Gcn4p Activation Domain Interacts Specifically In Vitro with RNA Polymerase II Holoenzyme, TFIID, and the Adap-Gcn5p Coactivator Complex. *Mol Cell Biol* **18**:1711-1724

Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* **7**(4):555-69

Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ, Yaffe MB (2000) The molecular basis of FHA Domain : Phosphopeptide binding specificity and implications for phosphodependent signaling mechanisms. *Molecular Cell* **6**, 1169-1182

Elion EA (2001) The Ste5p scaffold. *J Cell Sci* **114**:3967-3978

Elion EA (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opinion in Microbiol* **3**: 573-581

Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* **42**: 477-485

Esser D, Bauer B, Wolthius RMF, Wittinghofer A, Cool RH, Bayer P (1998) Structure determination of the Ras-binding domain of the Ral-specific guanine nucleotide exchange factor Rlf. *Biochem* **37**: 13453-13462

Feng Y, Song LY, Kincaid E, Mahanty SK, Elion EA (1998) Functional binding between Gbeta and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr Biol* **8**:267-278

Ferrell JE Jr. & Cimprich KA (2003) Enforced proximity in the function of a famous Scaffold. *Mol Cell* **11(2)**:289-91

Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of *HOG1* MAPK requires the importin β homologs *NMD5* and *XPO1*. *EMBO J* **17**: 5606-5614

Fields S & Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340(6230)**:245-6

Funk M, Müller R, Mumberg D (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucl Acids Res* **22**: 5767-5768

Gabrielli BG, Clark JM, McCormack AK, Ellem KAO (1997) Hyperphosphorylation of the N-Terminal Domain of Cdc25 Regulates Activity toward Cyclin B1/Cdc2 but Not Cyclin a/Cdk2. *J Biol Chem* **272**, 28607-28614

Gavrias V, Andrianopoulos A, Gimeno CJ, Timberlake WE (1996) *Saccharomyces cerevisiae* *TEC1* is required for pseudohyphal growth. *Mol Microbiol* **19**: 1255-1263

Gershon H & Gershon D (2000) The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. *Mech Aging* **120**: 1-22

Gilman AG (1987) G-Proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann Rev Biochem* **56**: 615-649

Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth; regulation by starvation and *RAS*. *Cell* **68**: 1077-1090

Gladfelter AS, Moskow JJ, Zyla TR, Lew DJ (2001) Isolation and Characterization of Effector-Loop Mutants of *CDC42* in yeast. *Mol Biol Cell* **12**: 1239-1255

Görner W, Durchschlag E, Wolf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schuller C (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO Journal* **21** (1 & 2) : 135-144

Güldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524

Gunderson SI, Beyer K, Martin G, Keller W, Boelens WC, Mattaj LW (1994) The human U1A snRNP protein regulates polyadenylation via a direct interaction with poly(A) polymerase. *Cell* **76(3)**:531-41

Gunderson SI, Vagner S, Polycarpou-Schwarz M, Mattaj IW (1997) Involvement of the carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase in U1A autoregulation and in the coupling of splicing and polyadenylation. *Genes Dev* **11(6)**:761-73

Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Mol Biol Rev*: 1264-1300

Hadley ME (1988) *Endocrinology*. 2nd ed., Engelwood Cliffs, N.Y., Prentice Hall

Hanahan D (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580

Hanahan D (1985) Techniques for Transformation of *E. coli*. Glover, DNA cloning, KIRL Press

Hepler JR & Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* **17**: 383-387

Herskowitz I (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**: 187-197

Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD, Gilman AG (1987) Effects of Mg²⁺ and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins. *J Biol Chem* **262**:762-766

Hinnebusch AG & Natarajan K. (2002) Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* **1(1)**:22-32

Hinnebusch AG (1992) General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling the synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. in the molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression, vol II, pp. 319-415, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Hirayama T, Maeda T, Saito H, Shinozaki K (1995) Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **249(2)**: 127-138

Hirt H (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* **2**: 11-15

Hohmann S (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66(2)**:300-72

Huang L, Weng X, Hofer F, Martin GS, Kim SH (1997) Three-dimensional structure of the Ras-interacting domain of RalGDS. *Nat Struct Biol* **4(8)**:609-15

Huang L, Hofer F, Martin GS, Kim SH (1998) Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nat Struct Biol* **5(6)**:422-6

Hubbard MJ & Cohen P (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* **18(5)**:172-7

Inoye C, Dhillon N, Thorner J (1997) Ste5 RING-H2 domain: role in Ste4 promoted oligomerization für yeast pheromone signaling. *Science* **278**: 103-106

Ishikawa T, Matsumoto K, Uno I (1988) Yeast mutants altered in the cAMP cascade system. *Methods Enzymol* **159**: 27-42

Ito H, Tung RT, Suyimoto T, Kobayashi I, Takahashi K, Katada T, Ui M, Kurachi Y (1992) On the mechanism of G-protein beta-gamma-subunit activation of the muscarinic K⁺channel in Guinea Pig atrial cell membrane. *J Gen Phys* **99**: 961-983

Jackson H & Bretscher A (2001) Ras Regulates the Polarity of the Yeast Actin Cytoskeleton through the Stress Response Pathway. *Mol Biol Cell* **12**: 1541-1555

James P, Halladay J, Craig EA (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144(4)**:1425-36

Jans DA (1995) The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation (Review). *Biochem J* **311**: 705-16

Jansen G, Bühring F, Hollenberg CP, Ramezani Rad M (2001) Mutations in the SAM domain of *STE50* differentially influence the MAPK-mediated pathways for mating, filamentous growth and osmotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **265**: 102-117

Jansen G (1998) Die Funktion von *STE50* bei der Signaltransduktion in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Düsseldorf

Johnson DI (1999) Cdc42: an essential Rho-Type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microb Mol Biol Rev* **63**: 54-105

Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**: 149-158

Kann M, Sodeik B, Vlachou A, Gerlich WH, Helenius A (1999) Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *Journal of Cell Biology* **145**: 45-55

Kido M, Shima F, Satoh T, Asato T, Kariya K, Kataoka T (2002) Critical function of the Ras-associating domain as a primary Ras-binding site for regulation of *Saccharomyces cerevisiae* adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **277**:3117-23

Kim D, Lewis DL, Grazeadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D, Clapham DE (1989) G-protein-subunits activate the cardiac muscarinic K⁺-channel via phospholipase A2. *Nature* **337**: 557-560

Klebe RJ, Harriss JV, Sharp ZD, Douglas MG (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25(2-3)**:333-41

Knippers, (1997) Molekulare Genetik, Thieme, 7. Auflage

Kobayashi N, McClanahan TK, Simon JR, Treger JM, McEntree K (1996) Structure and functional analysis of the multistress response gene DDR2 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**:540-547

Kyba M & Brock HW (1998) The SAM domain of polyhomeotic, RAE28, and scm mediates specific interactions through conserved residues. *Dev Genet* **22(1)**:74-84

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-705

Laloux M, van Schaftingen E, Francois J, Hers HG (1985) Phosphate dependency of phosphofructokinase 2. *Eur J Biochem* **148**, 155-159

Lamson RE, Winters MJ, Pryciak PM (2002) Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol Cell Biol* **22**:2939-2951

Leberer E, Wu C, Leeuw T, Fourest Lieuvin A, Segall JE, Thomas DY (1997) Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J* **16**: 83-97

Leberer E, Dignard D, Hargus L, Hougan L, Whiteway M (1993) Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* *STE5* as a suppressor of a *STE20* protein kinase mutant: structural and functional similarity of *STE5* to *FAR1*. *Mol Gen Genet* **241**: 241-254

Leberer E, Dignard D, Hougan L, Thomas DY, Whiteway M (1992) The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J* **11**: 4815-4824

Leberer E, Dignard D, Hougan L, Thomas DY, Whiteway M (1992) Dominant-negative mutants of a yeast G-protein β subunit identify two functional regions involved in pheromone signalling. *EMBO J* **11** (13): 4805-4813

Leberer E, Wu C, Leeuw T, Fougere Lieuvain A, Segall JE, Thomas DY (1996) Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J* **16**: 83-97

Lee BN & Elion EA (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signalling components. *Proc Natl Acad Sci* **96**(22): 12679-12684

Lee YJ, Lee Y, Chung JH (2000) An intronless gene encoding a poly(A) polymerase is specifically expressed in testis. *FEBS Lett* **487**(2):287-92

Leeuw T, Fougere-Lieuvain A, Wu C, Chenevert J, Clark K, Whiteway M, Thomas DY, Leberer E (1995) Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* **270**(5239):1210-3.

Linder ME, Gilman AG (1992) G proteins. *Sci Am* **267**: 56-61, 64-65

Lisziewicz J, Godany A, Förster HH, Küntzel H (1987) Isolation and nucleotide sequence of a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase gene suppressing the cell cycle start mutation *cdc25*. *J Biol Chem* **262**: 2549-2553

Liu H, Styles CA, Fink GR (1996) *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* **144**: 967-978

Lo WS & Dranginis AM (1996) The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphal formation and invasion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 161-171

Lorenz MC, Pan X, Harashima T, Cardenas ME, Xue Y, Hirsch JP, Heitmann J (2000) The G-protein-coupled receptor Gpr1 is a nutrient sensor that regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **154**: 609-622

Lorenz MC & Heitman J (1997) Yeast pseudohyphal growth is regulated by *GPA2*, a G-protein alpha homolog. *EMBO J* **16**: 7008-7018

Lu PJ, Zhou XZ, Shen MH, Lu KP (1999b) Function of WW domains as phosphoserine- or phosphothreonine-binding modules. *Science* **283**: 1325-1328.

Madhani HD, Styles CA, Fink GR (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**: 673-684

Maeda T, Takekawa M, Saito H (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554-558

Maeda T, Wurgler-Murphy SM, Saito H (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**: 242-245

Maniatis T., Fritsch E.G. & Sambrook J. (1982). „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Marcus S, Polverino A, Barr M, Wigler M (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci* **91**:7762-7766

Mösch HU, Kubler E, Krappmann S, Fink GR, Braus GH (1999) Crosstalk between the Ras2p-controlled mitogen-activated protein Kinase and cAMP pathways during invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 1325-1335

Mösch HU, Roberts RL, Fink GR (1996) Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase moduls to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 5352-5356

Moskow JJ, Gladfelter AS, Lamson RE, Pryciak PM, Lew DJ (2000) Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**:7559-7571

Mumberg D, Muller R, Funk M (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucl Acids Res* **22(25)**:5767-8

Nassoury N, Cappadocia M, Morse D (2003) Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. *J Cell Sci* **116(14)**:2867-74

Nehlin JO & Ronne H (1990) Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J* **9**: 2891-2898

Neiman AM & Herskowitz I (1994) Reconstitution of the protein kinase cascade in vitro: activation of the yeast kinase MEK homolog *STE7* by *STE11*. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 3398-3402

Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **28(3)**:239-42

Norman TC, Smith DL, Sorger PK, Drees BL, O'Rourke SM, Hughes TR, Roberts CJ, Friend SH, Fields S, Murray AW (1999) Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways. *Science* **285**:591-595

Nosworthy NJ, Peterkofsky A, Konig S, Seok YJ, Szczepanowski RH, Ginsburg A (1998) Phosphorylation Destabilizes the Amino-Terminal Domain of Enzyme I of the Escherichia Coli Phosphoenolpyruvate-Sugar Phosphotransferase System. *Biochemistry* **37**, 6718-6726

O'Rourke SM & Herskowitz I (1998) The Hog1p MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**: 2874-2886

O'Rourke SM & Herskowitz I (2003) Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol Biol Cell*. Oct 31 [Epub ahead of print]

Park SH, Zarrinpar A, Lim WA. (2003) Rewiring MAP kinase pathways using alternative scaffold assembly mechanisms. *Science* **299(5609)**:1061-4

Pawson T & Gish GD (1992) SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* **71(3)**:359-62

Peter M, Neiman AM, Park HO, van Lohuizen M, Herskowitz I (1996) Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J* **15**: 7046-7059

Petersen BO, Lukas J, Sorensen CS, Bartek J, Helin K (1999) Phosphorylation of mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* **18**, 396-410

Phizicky EM & Fields S (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59(1)**:94-123

Ponting CP (1995) SAM: a novel motif in yeast sterile and Drosophila polyhomeotic proteins. *Protein Sci* **4**: 1928-1930

Ponting CP & Benjamin DR (1996) A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci* **21**: 422-425

Posas F, Wurgler MS, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H (1996) Yeast *HOG1* MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the *SLN1-YPD1-SSK1* „two-component” osmosensor. *Cell* **86**: 865-875

Posas F & Saito H (1997) Osmotic activation of the *HOG* MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**: 1702-1705

Posas F & Saito H (1998) Activation of the yeast *SSK2* MAP kinase kinase kinase by the *SSK1* two component response regulator. *EMBO J* **17**:1385-1394

Posas F, Witten EA, Saito H (1998) Requirement of *STE50* for osmostress-induced activation of the *STE11* mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **18 (10)**: 5788-5796

Printen JA & Sprague GF Jr (1994) Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**:609-619

Pryciak PM & Huntress FA (1998) Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev* **12**:2684-2697

Ptashne M & Gann A. (2003) Signal transduction. Imposing specificity on kinases. *Science* **299(5609)**:1025-7

Raitt DC, Posas F, Saito H (2000) Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sh01-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J* **19**: 4623-31

Ramezani Rad M, Jansen G, Bühring F, Hollenberg CP (1998) Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol Gen Genet* **259**: 29-38

Ramezani Rad M, Xu G, Hollenberg CP (1992) *STE50*, a novel gene required for activation of conjugation at an early Stepp in mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **236**: 145-154

Ramezani Rad M, Luetzenkirchen K, Xu G, Kleinhans U, Hollenberg CP (1991) The complete sequence of a 11,953 bp fragment from C1G on chromosome III encompasses four open reading frames. *YEAST* **7**: 533-538

Ramezani-Rad M (2003) The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr Genet* **43(3)**:161-70

Reiser V, Ruis H, Ammerer G (1999) Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 1147-1161

Rep M, Reiser V, Gartner U, Thevelein JM, Hohmann S, Ammerer G, Ruis H (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol* **19(8)**:5474-85

Roberts RL & Fink GR (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974-85

Robinson MJ & Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**:180-186.

Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W et al. (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**, 2204-2215.

Rupp S, Summers E, Lo H-J, Madhani H, Fink G (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J* **18**: 1257-1269

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TI (1989) Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schaffhausen B (1995) SH2 domain structure and function [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **1242**, 61-75

Schmitt AP & McEntee K (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5777-5782

Shama S, Kirchman PA, Jiang JC, Jazwinski SM (1998) Role of RAS2 in Recovery from chronic stress: effects on yeast life span. *Exptl Cell Res* **245**: 368-78

Sikorski RS & Hieter P (1989) A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27

Simon MN, De Virgilio C, Souza B, Pringle JR, Abo A, Reed SI (1995) Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast matingpheromone signal pathway. *Nature* **376**:702-705

Stanhill A, Schick N, Engelberg D (1999) The Yeast Ras/Cyclic AMP Pathway Induces Invasive Growth By Suppressing The Cellur Stress Response. *Mol Cell Biol* **19**: 7529-7538

Steegenga WT, Eb AJvd, Jochemsen AG (1996) How phosphorylation regulates the activity of p53. *Journal of Molecular Biology* **263**, 103-113

Stryer L (1995) Biochemie, Spektrum, 4. Auflage

Suckow M & Hollenberg CP (1998) The activation specificities of wild-type and mutant Gcn4p in vivo can be different from the DNA binding specificities of the corresponding bZip peptides in vitro. *J Mol Biol* **276**(5): 887-902

Sugiura R, Toda T, Dhut S, Shuntoh H, Kuno T (1999) The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* **399**, 479-483.

Szilak L, Moitra J, Krylov D, Vinson C (1997) Phosphorylation Destabilizes Alpha-Helices. *Nature Structural Biology* **4**, 112-114

Taborsky G (1991) On the interaction of phosvitins with ferric ion: solubility of the Fe(III)-phosphoprotein complex under acidic conditions is a function of the iron/phosphate ratio and the degree of phosvitin phosphorylation. *J Inorg Biochem* **44**, 65-77

Takai Y, Sasaki T, Matozaki T (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**: 153-208

Teunissen AW, van den Berg JA, Steensma HY (1995) Localization of the dominant flocculation genes FLO5 and FLO8 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 735-745

Thanos CD & Bowie JU (1999) p53 family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Prot Sci* **8**: 1708-1710

Thevelein JM & de Winde JH (1999) Novel Sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microb* **33**: 904-918

Trueheart J, Boeke JD, Fink GR (1987) Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol* **7**: 2316-2328

Van Drogen F, O' Rourke SM, Stucke VM, Jaquenoud M, Neiman AM, Peter M (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signalling *in vivo*. *Curr Biol* **10**: 630-639

Wang Y, Xu HP, Riggs M, Rodgers L, Wigler M (1991) *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol Cell Biol* **11**(7):3554-63

Wang Y & Elion EA (2003). Nuclear export and plasma membrane recruitment of the Ste5 scaffold are coordinated with oligomerization and association with signal transduction components. *Mol Biol Cell* **14**(6):2543-58. Epub 2003 Feb 21

Whistler JL & Rine J (1997) Ras2 and Ras1 protein phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**: 18790-18800

Whiteway M, Hougan L, Thomas DY (1990) Overexpression of the *STE4* gene leads to mating response in haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**: 217-222

Wu C, Whiteway M, Thomas DY, Leberer E (1995) Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**:15984-15992

Wu C, Leberer E, Thomas D, Whiteway M (1999) Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **10**: 2425-2440

Wu C, Arcand M, Jansen G, Zhong M, Iouk T, Thomas DY, Meloche S, Whiteway M (2003) Phosphorylation of the MAPKKK regulator Ste50p in *Saccharomyces cerevisiae*: a casein kinase I phosphorylation site is required for proper mating function. *Eukaryot Cell* **2**(5):949-61

Xu G (1993) Characterization of *STE50*, a novel gene involved in pheromone response in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Düsseldorf.

Xu G, Jansen G, Thomas DY, Hollenberg CP, Ramezani Rad M (1996) Ste50p sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **20**: 773-783

Yaffe MB & Cantley LC (1999) Signal transduction - Grabbing phosphoproteins. *Nature* **402**, 30-31

Yaffe MB & Elia AEH (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Op Cell Biol* **13**, 131-138

Yaffe MB & Smerdon SJ (2001) Phosphoserine/threonine binding domains: You can't pSERious? *Structure* **9**, R33-R38

Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC (1997a) The Structural Basis for 14-3-3-Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* **91**, 961-971.

Zhao ZS, Leung T, Manser E, Lim L (1995) Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. *Mol Cell Biol* **15**:5246-5257

7 Abkürzungen

Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BCIP	Brom-Chlor-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenin- Monophosphat
CIP	Calf Intestine alkaline Phosphatase (Böhringer/Roche)
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GST	Gluthation-S-Transferase
Kb	Kilobasenpaare
M	Molar
NBT	Nitro-Blue-Tetrazoliumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	Open reading frame (offenes Leseraster)
ONPG	2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenii (Säurestärke)
RAD	Ras association domain
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-Galaktopyranosid

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. C. P. Hollenberg, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie anzufertigen und für die konstruktiven Diskussionen des letzten Jahres sowie seinen Einsatz gegen Ende der Arbeit.

Herrn PD Dr. Massoud Ramezani-Rad danke ich für das äußerst spannende Thema, die vielen Diskussionen und besonders für seinen Einsatz bei der Betreuung und Korrektur meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Wagner ganz besonders für die freundliche kurzfristige Übernahme des Ko-Referates trotz starker Inanspruchnahme von seiten anderer Doktoranden und Diplomanden.

Frau Anna Nagy danke ich für das Bereitstellen der vielen sterilen Kolben und Reagenzgläser und die heimlichen Aufräumarbeiten.

Carsten Amuel, Claudia Hopp, Zheng Hu, Anja Waran und Ute Gengenbacher danke ich besonders für ihre gute Laune und die Kameradschaft, die das Laborleben erst erträglich machen, sowie für all die kleinen und größeren Hilfen und die erheiternden Gespräche.

Der Essensrunde des Mibi-Institutes danke ich für das alltägliche Fitnesstraining auf dem Weg zur Mensa und die freundliche Atmosphäre.

Ich danke dem gesamten Institut für Mikrobiologie und seinen Mitarbeitern für das angenehme Arbeitsklima und die allgemeine Hilfsbereitschaft.

Insbesondere meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung und den emotionalen Rückhalt während der Doktorarbeit, deren Vollendung mir dadurch überhaupt erst möglich wurde.

Auch allen meinen Freunde danke ich für die Freizeitgestaltung und die Entspannung, sowie für ihr Verständnis, dass ich in letzter Zeit nicht zur Verfügung stand.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Doktorarbeit selbständig und mit keinen anderen als den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, 12. Dezember 2003